

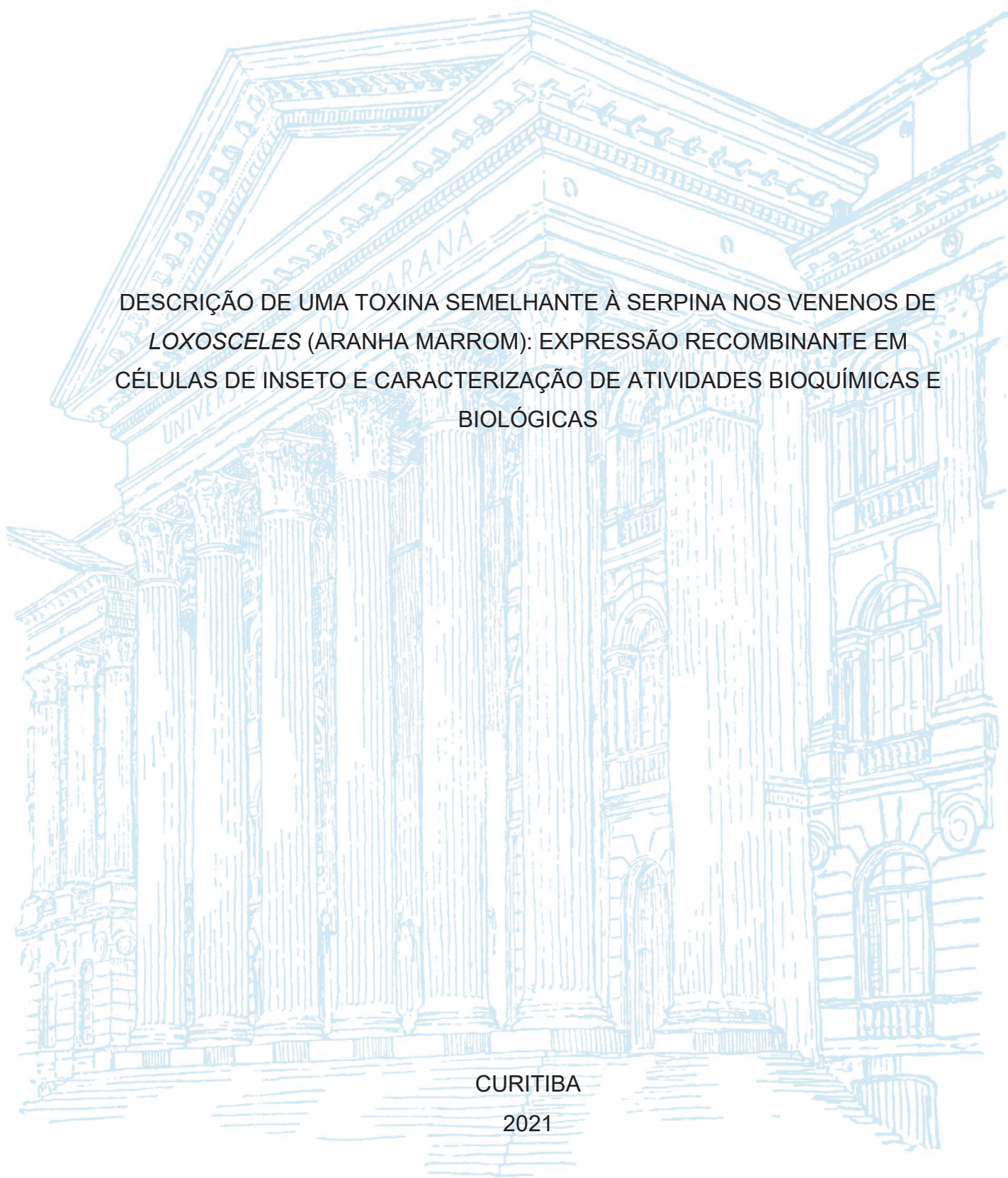
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ZELINDA SCHEMCZSSEN GRAEFF

DESCRIÇÃO DE UMA TOXINA SEMELHANTE À SERPINA NOS VENENOS DE
LOXOSCELES (ARANHA MARROM): EXPRESSÃO RECOMBINANTE EM
CÉLULAS DE INSETO E CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E
BIOLÓGICAS

CURITIBA

2021



ZELINDA SCHEMCZSSEN GRAEFF

DESCRIÇÃO DE UMA TOXINA SEMELHANTE À SERPINA NOS VENENOS DE
LOXOSCELES (ARANHA MARROM): EXPRESSÃO RECOMBINANTE EM
CÉLULAS DE INSETO E CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E
BIOLÓGICAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Departamento de
Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia
Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga.
Coorientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Graeff, Zelinda Schemczssen.

Descrição de uma toxina semelhante à serpina nos venenos de
Loxosceles (aranha marrom): expressão recombinante em células de inseto
e caracterização de atividades bioquímicas e biológicas. / Zelinda
Schemczssen Graeff. – Curitiba, 2021.

111 f. : il.

Orientador: Silvio Sanches Veiga.

Coorientadora: Luiza Helena Gremski.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Aranhas - Veneno. 2. Baculoviridae. 3. Loxosceles. 4. Inseto. 5.
Inibidores de serino proteinase. I. Título. II. Veiga, Silvio Sanches. III.
Gremski, Luiza Helena. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

CDD (20. ed.) 595.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ZELINDA SCHEMCZSEN GRAEFF** intitulada: **TÍTULO: DESCRIÇÃO DE UMA TOXINA SEMELHANTE À SERPINA NOS VENENOS DE LOXOSCELES (ARANHA MARROM): EXPRESSÃO RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE INSETO E CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS**, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO SANCHES VEIGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica
01/04/2021 11:24:34.0
SILVIO SANCHES VEIGA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
01/04/2021 11:25:29.0
LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
02/04/2021 06:27:00.0
SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/04/2021 13:54:13.0
FRANCISCO FILIPAK NETO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
13/04/2021 09:45:03.0
MARCIA HELENA APPEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

À minha querida mãe Tereza que é maravilhosa, exemplo de força e positividade. Ao meu pai Elvino “*in memoriam*”, que foi um pai por excelência.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida cheia de possibilidades.

Ao meu amado esposo Samuel, meu companheiro de vida.

À minha mamãe que está sempre torcendo por mim e ao meu papai, *in memoriam*, que sempre me incentivou a ser o que eu quisesse ser.

Às minhas irmãs pela companhia e pelo amor.

Aos meus cunhados e sobrinhos pela companhia.

Ao meu orientador, Professor Doutor Silvio Sanches Veiga, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo o aprendizado, aprendi sobre fazer ciências, perseverar nas dificuldades e seguir em frente não focando nos problemas e sim nas soluções. Aprendi muito na teoria e na prática isso já abriu um universo de possibilidades para que eu siga na docência e na pesquisa e seja uma ótima profissional.

À minha coorientadora Professora Doutora Luiza Helena Gremski, que é uma excelente professora e cientista, e que além disso gosta do que faz, e faz por excelência, trabalha muito para manter o laboratório funcionando, é muito dedicada e sempre me atendeu muito bem. Só tenho gratidão por tudo o que me ensinou.

À Professora Doutora Célia Regina Cavichiolo Franco, por orientar meu estágio em docência na sua turma de odontologia, a experiência me trouxe muito aproveitamento. Pessoa maravilhosa, cientista e professora, tudo por excelência.

À professora Doutora Olga Meiri Chaim pelas suas contribuições no início do desenvolvimento da minha pesquisa, por suas dicas e a forma como me incentivou.

Ao professor Silvio Marques Zanata e a professora Lia Sumie Nakao por gentilmente cederem o uso de equipamentos do laboratório de Neurobiologia.

Ao professor Doutor Marcel Ivan Ramirez, por ceder seu laboratório para a realização do ensaio do sistema complemento com *T. cruzi*.

À Hanna Câmara da Justa e Elidiana de Bona porque pudemos padronizar o sistema de produção de proteínas em células de inseto, a vocês minha gratidão por todas as contribuições.

À Antonielle Baldissera pelas suas contribuições com os ensaios com células tumorais.

À Nayanne Louise Costacurta Polli pelas suas contribuições com os ensaios de Elisa.

À Mariana Bóia Ferreira pelas suas contribuições.

Ao Pedro Henrique de Caires Schluga, pelas contribuições e pela companhia alegre, trazendo um alto astral para o laboratório.

À Izabel de Oliveira Leite pela companhia e pelas contribuições.

À Thaís Pereira da Silva minha companheira de seleção para o ingresso no doutorado, por todas as contribuições.

Ao Bruno César Antunes por todo apoio e contribuições.

Ao querido Rafael Euclides dos Santos, por ser essa pessoa querida e pelas contribuições.

Aos colegas de laboratório que conheci logo que iniciei a minha pesquisa, e que hoje não estão mais no laboratório, mas que com suas experiências contribuíram muito para o sucesso do meu doutorado, com vocês eu me inspirei e aprendi muito, Larissa Vuitika, Fernando Hitomi Matsubara, Dilza Trevisan Silva, Adriano Marcelo Morgon, Gabriel Otto Meissner, Aline Viana Bednaski e Vanessa Ribeiro.

Às amigas do Laboratório de Neurobiologia da UFPR Soraia, Silvia e Ingrid pelas contribuições.

Ao Lucas, secretário do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR pelo auxílio nas questões burocráticas.

Ao professor Doutor Roberto Ferreira Artoni meu orientador do mestrado pelo incentivo e contribuições na minha vida acadêmica.

Ao professor Marcos Pileggi pela parceria e incentivo na minha vida acadêmica.

À minha amiga Elizangela Paz de Oliveira pela nossa parceria e amizade que teve início no mestrado.

À minha amiga Ieda pela parceria que começou na graduação.

Ao CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos) na pessoa do João Carlos Minozzo e demais funcionários por gentilmente cederem os venenos das aranhas *L. intermedia* *L. laeta* e *L. gaucho*.

À CAPES, Fundação Araucária, SETI e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir”.

Friedrich Nietzsche

“Follow your bliss and the universe will open doors where there were only walls”.

Joseph Campbell

RESUMO

A toxínologia é a área da ciência que se dedica ao estudo das toxinas de animais como serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas, vespas, entre outros animais, bem como, as características destas toxinas, suas funções, metabolismo, efeitos nocivos, tratamentos e aplicações biotecnológicas. Muitas toxinas já foram estudadas e trazem grande contribuição biotecnológica e farmacêutica para a humanidade, tendo como um exemplo, o fármaco captopril, cujo princípio ativo do medicamento teve origem em um peptídeo extraído do veneno da *Bothrops jararaca*. As serpinas são moléculas que são descritas no organismo e em venenos de diferentes espécies, como abelhas, serpentes e aranhas essas moléculas atuam como inibidores de serino protease, e participam de processos fisiológicos importantes, já bem entendidos na literatura. A proteólise não regulada de diferentes substratos pode levar ao surgimento de doenças como o câncer e a trombose, portanto, as funções desses inibidores são fundamentais para o bom funcionamento do organismo. Nesse trabalho foi identificado uma serpina extraída da glândula de veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*, com aproximadamente 1197 pares de bases. Esta proteína foi clonada e produzida na forma recombinante, em um sistema eucarioto, usando a linhagem de células de inseto Sf9 e recebeu o nome de LSPILT (do Inglês *Loxosceles Serine Protease Inhibitor-Like Toxin*). Essa pesquisa é de grande relevância porque o conhecimento sobre o mecanismo de ação e da função da serpina do veneno da aranha marrom é limitado, visto que, essa é a primeira vez que uma serpina do gênero *Loxosceles* foi clonada e produzida na forma recombinante. A produção da LSPILT foi feita em células de inseto, e a purificação por cromatografia de afinidade em Níquel-Agarose, originando uma proteína solúvel com aproximadamente 46 kDa. Os ensaios de padronização da síntese dessa proteína mostraram que o fracionamento da adição da titulação viral foi imprescindível para o sucesso da produção em massa que resultou em 8 mg/mL. As análises bioquímicas foram feitas por *SDS-PAGE* e *immunoblotting* e ELISA mostrando conservação biológica desta molécula em diferentes venenos de espécies de *Loxosceles*. As avaliações bioquímicas e biológicas mostraram que a LSPILT inibe a degradação da gelatina na presença de tripsina, mostrou atividade inibitória frente a morte de *T. cruzi* causada por convertases do sistema complemento, inibiu a formação de trombo em plasma estimulada pela trombina, além de inibir a migração de células de melanoma (B16-F10). Os dados obtidos a partir desta pesquisa contribuem para a caracterização de uma serpina nos venenos de *Loxosceles* abrindo possibilidades de futuros estudos estruturais, compreensão da participação desta molécula no quadro do envenenamento e aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Aranha Marrom. Veneno. Baculovírus. Célula de inseto. Inibidor de serino protease.

ABSTRACT

Toxinology is the area of science dedicated to the study of toxins from animals such as snakes, spiders, scorpions, bees, wasps, among other animals, as well as the characteristics of these toxins, their functions, metabolism, harmful effects, treatments, and biotechnological applications. Many toxins have already been studied and brought a great biotechnological and pharmaceutical contribution to humanity. Captopril, for example, originated from a peptide extracted of the venom of *Bothrops jararaca*. Serpins are molecules that act as inhibitors of serine proteases, which are enzymes that participate in well understood and important physiological processes. The unregulated proteolysis of different substrates can lead to the appearance of diseases such as cancer and thrombosis. Therefore, the function of these inhibitors is essential for the proper functioning of the body. In this work was identified a sequence from the brown spider venom gland of *Loxosceles intermedia* that encodes a serpin, with approximately 1197 base pairs. This protein was cloned and produced as a recombinant protein in a eukaryotic system, using the Sf9 insect cell and was named LSPILT (Loxosceles Serine Protease Inhibitor-Like Toxin). This study is of great relevance because the knowledge about the mechanism of action and function of the brown spider venom serpin is limited since this is the first time that a serpin of the genus *Loxosceles* has been produced recombinantly. The main objective is the expression of the *L. intermedia* serpin, in a eukaryotic expression system, through the baculovirus/insect cells system, in addition to characterizing this molecule biochemically and investigating and evaluating its biological activities. The purification of LSPILT was performed by affinity chromatography in Nickel-Agarose originating a soluble and active protein with approximately 46 kDa. Initial assays for the synthesis of this protein showed that the fractioning of the addition of viral titration was essential for the success of mass production, which resulted in 8 mg/mL. Biochemical analyzes were assessed by SDS-PAGE, pointing that LSPILT was obtained in a pure form. Through immunoblotting and ELISA it was shown that LSPILT is a conserved molecule among different *Loxosceles* species. Biological evaluations pointed that LSPILT inhibits the degradation of gelatin in the presence of trypsin. In addition, LSPILT showed inhibitory activity of complement system convertases that induce the death of *Trypanosoma cruzi*, inhibited the coagulation induced by thrombin, and reduced the migration of melanoma B16-F10 cells. The data obtained from this research contribute to the characterization of a serpin and open the possibility of future structural and biotechnological studies.

Keywords: Brown spider. Venom. Baculovirus. Insect cell. Serine protease inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GRÁFICO COM OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ACIDENTES COM ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> DIVULGADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO	26
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO A INTERAÇÃO ENTRE A TRIPSINA E O PAR-2 NA ATIVAÇÃO MMPS	30
FIGURA 3 – PAINEL MOSTRANDO AS VIAS INTRÍNSECA E COMUM DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	38
FIGURA 4 – PAINEL MOSTRANDO AS ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO COVALENTE ENTRE A SERPINA E A SERINO PROTEASE	39
FIGURA 5 – ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO A BIOLOGIA DO BACULOVÍRUS	40
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA 1: TESTES DE PADRONIZAÇÕES DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADA	54
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA 2: TESTES DE PADRONIZAÇÕES DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS CULTIVADAS EM SUSPENSÃO	55
FIGURA 8 – ENSAIO DE <i>IMMUNOBLOTTING</i> PARA VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LSPILT	82
FIGURA 9 – GEL DE ELETROFORESE A 12,5%	83
FIGURA 10 – GEL DE ELETROFORESE A 12,5%, ENSAIO QUALITATIVO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA TRIPSINA SOBRE A VITRONECTINA PELA LSPILT	84
FIGURA 11 – EFEITO DA LSPILT NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LSPILT ...81

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

B16-F10 - Linhagem celular de melanoma murino

BSA - *Bovine Serum Albumin*

C - Convertase

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar

DAF - *Decay-Accelerat-ing Factor*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - *Dimethyl Sulfoxide*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF-R - *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FAK - *Focal Adhesion Kinase*

FGF - *Fibroblast Growth Factor*

ICK - *Inhibitor Cystine Knot*

IFN- β - *Interferon Beta*

LSPILT - *Loxosceles Serine Protease Inhibitor-Like Toxin*

MASP - *(Mannose-Binding Lectin (MBL) - Associated Serine Protease)*

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

MMP - Metaloprotease de Matriz

MOI - *Multiplicity of Infection*

MTT- *(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)*

PAR-2 - *Proteinase-Activated Receptor 2*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PFU - *Plaque-Forming Unit*

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

Pró-MMPs - Metaloproteinases de Matriz inativas

RCA - *Regulation of Complement Activation*

RNA - Ácido Ribonucleico

RPMI - *Roswell park Memorial Institute Medium*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SFB - Soro Fetal Bovino

Sf9 - Linhagem celular de *Spodoptera frugiperda*

Sf21 - Linhagem celular de *Spodoptera frugiperda*

SNH - Soro Normal Humano

STAT - *Signal Transducers and Transcription Activators*

TCTP - *Translationally Controlled Tumor Protein*

TGF - *Transforming Growth Factor*

TMPRSS - *Transmembrane Serine Protease*

uPA - *Urokinase Plasminogen Activator*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

LISTA DE SÍMBOLOS

® Registro, marca registrada

™ *Trade Mark*, marca comercial

∞ Infinito, ciclo de espera da PCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.1.1 Objetivos específicos.....	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 ARANHA MARROM – ASPECTOS GERAIS	25
4.1.1 Loxoscelismo.....	25
4.1.2 Veneno da aranha marrom.....	26
4.2 PROTEASES - SERINO PROTEASE	27
4.2.1 Inibidor de serino protease: Serpina.....	32
4.2.2 Serpinas com atividade antitumoral	34
4.2.3 Serpinas com atividade modulatória do sistema complemento.....	36
4.2.4 Serpinas com atividade modulatória da coagulação sanguínea.....	36
4.2.5 Mecanismo de ação das serpinas	38
4.3 SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVÍRUS/ CÉLULAS DE INSETO	40
4.3.1 Biologia molecular do baculovírus	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 CULTURA DE CÉLULAS	44
5.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA A REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA: 5'RACE e 3'RACE.....	44
5.2.1 Extração dos fragmentos do gel de agarose	45
5.3 REAÇÃO DE DIGESTÃO DA CONSTRUÇÃO DA SERPINA CLONADA EM pGEM-T.....	46
5.4 REAÇÕES DE PCR	46
5.5 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE	47
5.6 REAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO	47
5.7 PROCEDIMENTO DE CLONAGEM/TOPO®	48
5.7.1 Transformação em <i>E. coli</i> quimicamente competente.....	49
5.7.2 Reação de recombinação.....	49
5.7.3 Preparando as células para a transfecção	50
5.7.4 Transfecção.....	50

5.8 PRIMEIRO ESTOQUE VIRAL (P1)	50
5.8.1 Segundo estoque viral (P2)	50
5.8.2 Terceiro estoque viral (P3)	51
5.8.3 Quarto estoque viral (P4)	51
5.8.4 Isolamento do DNA para titulação viral	52
5.9 QUANTIFICAÇÃO DA TITULAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR	52
5.10 PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SERPINA RECOMBINANTE EM MODELO EUCARIOTO	52
5.11 PURIFICAÇÃO	56
5.12 SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	56
5.13 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	57
5.14 ELISA (<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	58
5.15 ANÁLISES DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS	59
5.15.1 Zimograma reverso	59
5.15.2 Detecção qualitativa da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a tripsina	59
5.15.3 Detecção quantitativa da atividade inibitória de serpina recombinante sobre a tripsina	60
5.15.4 Detecção da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a morte de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediados pelo sistema complemento	60
5.15.5 Detecção da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a trombina ..	61
5.15.6 Ensaio de atividade inibitória da serpina recombinante sobre a migração de células de melanoma B16-F10 <i>in vitro</i> por ensaio de “scratch”	61
5.15.7 Ensaio de viabilidade celular	62
5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5.17 ANÁLISE ESTRUTURAL E DE SIMILARIDADE	62
6 CAPÍTULO I: DESCRIPTION OF A SERPIN TOXIN IN <i>Loxocles</i> (BROWN SPIDER) VENOMS: CLONING, EXPRESSION IN BACULOVIRUS-INFECTED INSECT CELLS AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION	65
7 CAPÍTULO II – PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LSPILT EM SISTEMA EUCARIOTO usando CÉLULAS DE INSETOS	80
7.1 RESULTADOS	80
8 DISCUSSÃO	86
9 CONCLUSÕES	90

10 REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO 1 – ARTIGO 1 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	104
ANEXO 2 – ARTIGO 2 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	105
ANEXO 3 – ARTIGO 3 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO	106
ANEXO 4 – COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	107
ANEXO 5 – CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICA.....	108

1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho foi isolado e clonado um transcrito de uma proteína, toxina do genoma da glândula de veneno da aranha marrom, *L. intermedia*, essa molécula foi expressa de forma recombinante em um sistema eucarioto usando células Sf9 uma linhagem de células de inseto. Esse transcrito codifica uma serpina (GREMSKI, 2010).

Os membros da família das serpinas compartilham uma grande estrutura central conservada que é crítica para o seu funcionamento como inibidores de serino protease. Portanto, as descobertas e inferências sobre uma serpina podem estar relacionadas à outras (HUNTINGTON, 2011).

Inibidores de serino protease já foram descritos em diferentes espécies, tais como em mariposa *Manduca sexta* e mosca *Drosophila melanogaster* (KANOST, 1990) serpentes das espécies *Vipera ammodytes* (ŽUPUNSKI; KORDIŠ; GUBENŠEK, 2003) e *Bungarus multicinctus* (CHOU *et al.*, 2010), aranhas tarantulas das espécies *Ornithoctonus huwena* e *Ornithoctonus hainana* (YUAN *et al.*, 2008).

Os inibidores de serino protease são classificados conforme a sequência primária, estrutura da sequência e mecanismos de ligação com proteases. São agrupados em três superfamílias de acordo com seu mecanismo de ação, sendo os inibidores canônicos, os inibidores não-canônicos e as serpinas (OTLEWSKI; KROWARSCH; APOSTOLUK, 1999; KROWARSCH *et al.*, 2003). Moléculas do tipo serpinas já foram identificadas em venenos e peçonhas, tais como em *Nasonia vitripennis* (DANNEELS; RIVERS; DE GRAAF, 2010) *Crotalus adamanteus* (ROKYTA *et al.*, 2012) e *Grammostola iheringi* (BORGES *et al.*, 2016).

Inibidores de serino protease modulam proteases que além da sua importância fisiológica, têm como característica serem potencialmente nocivas para o ambiente proteico de uma célula ou de um organismo (SILVA-LOPEZ, 2009). As proteases estão envolvidas em processos fisiológicos essenciais, que podem estar relacionados a imunidade, inflamação, remodelagem de tecido, eliminação de patógenos e apoptose (PODDAR; MAURYA; SAXENA, 2017) por isso, suas atividades requerem um controle preciso.

A superexpressão de proteases e a não regulação das atividades celulares mediadas por proteases levam a processos patológicos que podem se instalar e até mesmo levar um indivíduo à morte, enfermidades como enfisema pulmonar, epilepsia,

síndrome de Netherton, doenças hepáticas, câncer, doenças reumáticas, doenças degenerativas, doenças autoimunes, distúrbios de coagulação sanguínea estão relacionadas a desregulação proteolítica (HEAL; WICKRAMASINGHE; TATE, 2008; KUESTER *et al.*, 2008; BERG, 2010; ALCANTARA; DASS, 2013).

Há um crescente interesse na família das serpinas, já que atuam em processos diversos, dependentes do controle de protease (HEUTINCK *et al.*, 2010) tais como, coagulação sanguínea, fibrinólise, apoptose, inflamação, ativação do sistema complemento e atividade antitumoral (BABCOCK; MARMER; STEELE, 1986; ZHANG *et al.*, 2000; SCHAEFER; ZHANG, 2005; CARNEIRO-LOBO *et al.*, 2009; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2016; BHAKUNI *et al.*, 2016; KATSUKAWA *et al.*, 2018; KEIZER *et al.*, 2015; JEDLIČKOVÁ *et al.*, 2019).

Sendo assim, essa pesquisa tem como objetivo caracterizar, investigar e avaliar atividades biológicas e bioquímicas de uma serpina de *L. intermedia* sintetizada de forma recombinante em um sistema eucarionte usando células de inseto.

A utilização de modelos de expressão baseados em células eucariontes é uma metodologia alternativa para a expressão de proteínas, e o diferencial desses sistemas reside no fato de estas células terem sistemas de endomembranas e originarem proteínas com conformações nativas (JAYAKUMAR, 2004).

Os baculovírus recombinantes são amplamente utilizados no meio científico como ferramenta para expressão de genes heterólogos em células de inseto mantidas em cultura (MOUREZ *et al.*, 2007; VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015; NASIMUZZAMAN; VAN DER LOO; MALIK, 2018). Uma característica importante descrita para esse sistema de expressão é sua maior eficiência na síntese de proteínas com dobramentos conformacionais, por isso, as células de inseto são adequadas para a expressão de glicoproteínas, proteínas biologicamente ativas e imunogênicas (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

As proteínas expressas utilizando esse sistema são facilmente purificadas e possuem potencial biotecnológico diverso podendo ser usada na pesquisa, sistemas de diagnósticos e na produção de fármacos e vacinas (HARPER *et al.*, 2006; NASIMUZZAMAN; VAN DER LOO; MALIK, 2018; YAN *et al.*, 2019). A primeira vacina humana licenciada produzida com o sistema de expressão de baculovírus foi contra o vírus que causa o câncer cervical (HARPER *et al.*, 2006).

A utilização deste tipo de sistema de expressão de proteínas pode facilitar a caracterização biológica de inibidores que foram identificados nos transcritos das

glândulas de veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* e irão contribuir para a descrição da função destas moléculas, na biologia celular do envenenamento e seu efeito na lesão da picada. Além disso, poderão trazer contribuições biotecnológicas a partir da descoberta das atividades biológicas desta molécula visto que, como mencionado acima, há um crescente interesse da indústria farmacêutica em moléculas pertencentes à família das serpinas.

2 JUSTIFICATIVA

O limitado conhecimento sobre o mecanismo de ação e da função da serpina para a compreensão da sua participação no envenenamento pela aranha marrom.

A produção de uma toxina do veneno de aranha marrom em um sistema eucarioto utilizando células de inseto e a tecnologia do baculovírus recombinante mostrando o nosso pioneirismo em relação ao uso desse sistema de expressão para obter a serpina recombinante de *L. intermedia* e finalmente obter a caracterização bioquímica e biológica desse inibidor, além de investigar potenciais aplicações biotecnológicas e terapêuticas (PELTIER *et al.*, 2016; CARRELL; READ, 2017; LU; WANG; LIANG, 2017) inovando e trazendo resultados por meio da pesquisa científica que contribuem para o avanço da ciência do País.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de uma serpina, solúvel e ativa a partir do mRNA extraído da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom), por meio do sistema de expressão eucarioto, através de baculovírus recombinante e células de inseto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) para a caracterização bioquímica e biológica dessa proteína.

3.1.1 Objetivos específicos

1. Clonar e produzir uma serpina recombinante presente no veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*;
2. Avaliar a serpina recombinante quanto a atividades biológicas, na atividade de inibição de convertases do sistema complemento na lise de *Trypanosoma cruzi* e avaliar o potencial antitumoral da serpina recombinante sobre células B16-F10;
3. Caracterizar a serpina recombinante quanto a atividades bioquímicas na atividade de inibição da trombina e da tripsina;
4. Produzir anticorpos policlonais que reconheçam essa toxina;
5. Investigar a presença desses inibidores em venenos de outras espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*;
6. Avaliar a similaridade da serpina do veneno de *Loxosceles intermedia* com sequências de serpinas de diferentes espécies.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ARANHA MARROM – ASPECTOS GERAIS

As aranhas que pertencem ao gênero *Loxosceles* são popularmente denominadas aranhas marrons. O nome é dado devido a coloração desses animais, que pode variar de marrom-claro a marrom-escuro. As aranhas desse gênero também são conhecidas como aranhas-violino, já que possuem um desenho na parte posterior do cefalotórax, que lembra este instrumento musical (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004). As aranhas marrons são aracnídeos pequenos com tamanho corporal de 8 a 15 mm e suas pernas podem chegar a medir 30 mm (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014). Essas aranhas podem viver de 3 a 7 anos (GONÇALVES DE ANDRADE; LOURENÇO; TAMBOURGI, 2000). Tem comportamento sedentário e noturno (DE ANDRADE *et al.*, 1999). Podem suportar temperaturas que variam de 8 a 43 °C e podem sobreviver por vários dias ou até meses sem comida e água (FUTRELL, 1992). Essas aranhas constroem teias irregulares que se parecem com fios de algodão (FUTRELL, 1992). A composição das teias de fêmeas maduras de *L. arizonica* e *L. laeta* é muito semelhante e rica em glicina e alanina (CODDINGTON; HISSANICK, 2001). A aranha marrom não é agressiva, e seu habitat preferencial predominante são áreas escuras (FUTRELL, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2002).

4.1.1 Loxoscelismo

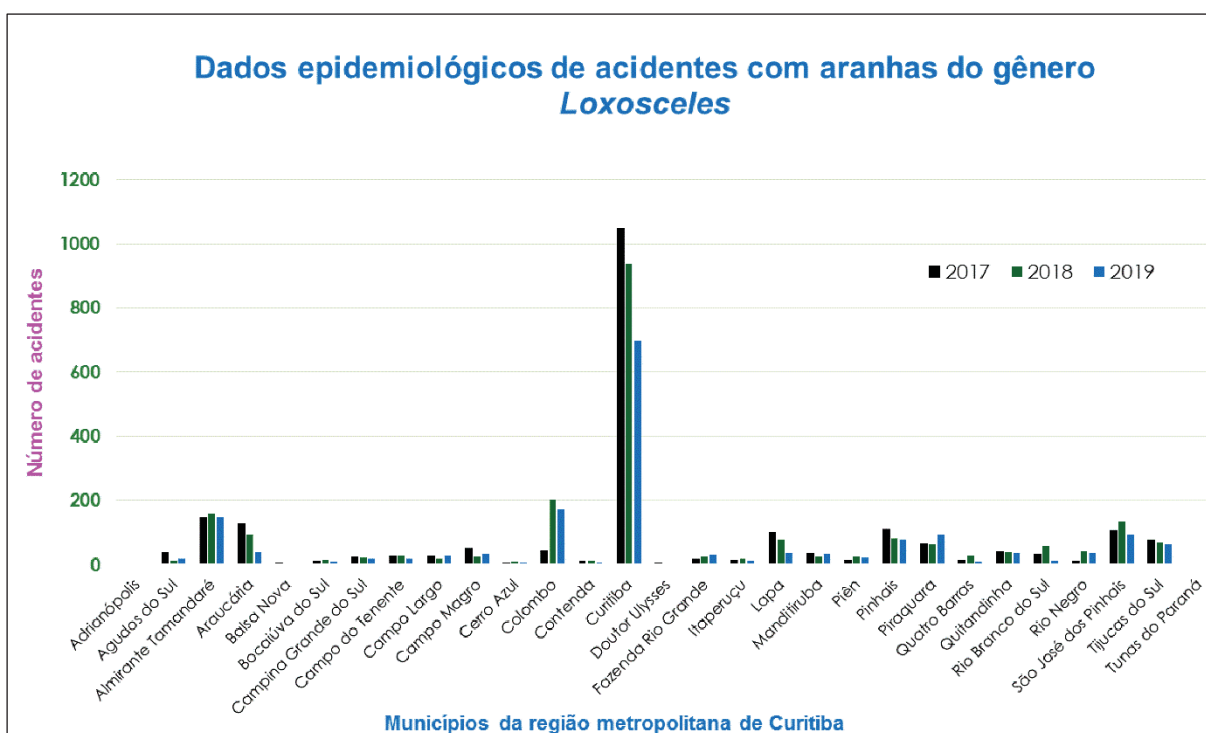
O loxoscelismo refere-se às manifestações clínicas que resultam de picadas e envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). O loxoscelismo é caracterizado por lesões na pele no local da picada incluindo inchaço, eritema, hemorragia e dermonecrose. Casos mais graves podem apresentar acometimento sistêmico, sendo os principais sintomas a hemólise intravascular e a insuficiência renal (DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON; VETTER, 2006; GREMSKI *et al.*, 2014). Os acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* ocorrem em vários estados do Brasil. As regiões Sul e Sudeste são as que

mais registram casos de acidentes com aranhas marrons. As espécies envolvidas nesses acidentes são de *L. intermedia*, *L. gauch*o e *L. laeta* (DA SILVA *et al*, 2004).

Os acidentes são notificados e os dados são disponibilizados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). A FIGURA 1 mostra os números de acidentes ocorridos na região metropolitana de Curitiba nos anos de 2017, 2018 e 2019, e estão disponíveis na plataforma do SINAN.

Foi divulgado no site da Prefeitura Municipal que Curitiba registrou 472 acidentes com aranha do gênero *Loxosceles* em 2020 o menor número de acidentes dos últimos 28 anos, em 2019 o número de acidentes foi de 848, segundo Marcelo Vettorello, Biólogo do Centro de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, essa queda significativa pode ter relação direta com a pandemia da Covid-19, que fez com que as pessoas ficassem mais em casa e aumentassem os cuidados com a limpeza das residências, que é uma forma de prevenção de acidentes (Comunicação pessoal).

FIGURA 1 – GRÁFICO COM OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ACIDENTES COM ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* DIVULGADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: Acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* na região metropolitana de Curitiba-PR nos anos de 2017, 2018 e 2019.

4.1.2 Veneno da aranha marrom

As aranhas fêmeas de *L. intermedia* produzem mais veneno do que os machos e isso pode estar relacionado ao seu maior comprimento e peso comparado aos machos. O veneno das fêmeas causa uma reação dermonecrótica mais severa em coelhos (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999).

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino, composto por uma mistura proteica de compostos biológicos ativos, e apresenta grande quantidade e variedades de enzimas em sua composição (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2014). Muitas proteínas que compõem o veneno já foram descritas, entre elas as fosfolipases-D, metaloproteases, hialuronidases, serino proteases, inibidor de serino protease, peptídeos inseticidas da família ICK (*Inhibitor Cystine Knot*), TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) e alérgenos (MACHADO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010; JUSTA *et al.*, 2020; DE-BONA *et al.*, 2021).

As toxinas altamente expressas em veneno de *L. intermedia* são: peptídeos potencialmente inseticidas (55,9% dos transcritos de toxinas), metaloproteases do tipo astacinas (22,6%) e fosfolipases-D (20,2%). Já as hialuronidases, serino proteases, TCTP, inibidores de serino protease e alérgenos são pouco expressos e, juntos, não somam 1,5% do total de transcritos referentes as toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2021).

Muitas das proteínas nativas não são expressas na quantidade ideal para testar a atividade e o potencial biotecnológico dessas toxinas, e neste sentido, para se alcançar quantidades maiores são empregados métodos de produção de proteínas recombinantes. Esses métodos incluem sistemas procariontes ou eucariontes. Por meio da tecnologia da expressão recombinante, várias toxinas do veneno da aranha marrom já foram expressas e descritas, como as fosfolipases-D, astacinas, notinas, TCTP, alérgeno, hialuronidases e uma serpina (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011; SADE *et al.*, 2012; FERRER *et al.*, 2013; MATSUBARA *et al.*, 2013; VUITIKA *et al.*, 2013; JUSTA *et al.*, 2020; DE-BONA *et al.*, 2021; SCHEMCZSEN-GRAEFF *et al.*, 2021).

4.2 PROTEASES - SERINO PROTEASE

As proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais para os

organismos, tais processos incluem: digestão e assimilação das moléculas alimentares, degradação de proteínas nos lisossomos e nos proteossomos, ativação da cascata de coagulação, sistema complemento e funções de sinalização intracelular, fibrinólise, degradação de moléculas da matriz extracelular, dentre outros processos (NEURATH, 1989).

No entanto, estudos têm mostrado que as proteases também estão envolvidas na progressão e no crescimento de tumores primários e metastáticos (YANG *et al.*, 2006; RAKASHANDA *et al.*, 2012). Em todas as etapas a partir do início do tumor, crescimento, metástase e invasão envolvem cinco classes de proteases, ou seja, serino, cisteíno, aspartato, treonina e metaloproteases da matriz extracelular (CHAMBERS; MATRISIAN, 1997; LOCHTER *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1998; MOOK; FREDERIKS; VAN NOORDEN, 2004; DEU; VERDOES; BOGYO, 2012). Outras enfermidades como enfisema pulmonar, epilepsia, síndrome de Netherton, doenças hepáticas, doenças reumáticas, doenças degenerativas, doenças autoimunes, dentre outras também estão relacionadas a um descontrole da atividade das enzimas proteolíticas (HEAL; WICKRAMASINGHE; TATE, 2008; KUESTER *et al.*, 2008).

Serino proteases, são proteases que clivam ligações peptídicas e são caracterizadas por possuírem um resíduo do aminoácido serina no sítio catalítico, o qual é essencial para o ataque nucleofílico do substrato (HEDSTROM, 2002). Mais de um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas são serino proteases (DI CERA, 2009). Do ponto de vista estrutural, as serino proteases foram conhecidas pela presença da chamada "tríade catalítica" composta pelos aminoácidos Asp-His-Ser (DODSON; WLODAWER, 1998). Essas moléculas geralmente após sintetizadas permanecem como zimogênios e são ativados por proteólise, o que por sua vez regula as atividades enzimáticas (DI CERA, 2009).

As serino proteases, assim como as proteases em geral, realizam uma ampla gama de funções fisiológicas e celulares, desde processos digestivos, bem como ativação de processos tais como, coagulação sanguínea, imunidade celular e humoral, fibrinólise, fertilização, desenvolvimento embrionário, processamento de proteínas e remodelação de tecidos (KREM; DI CERA, 2001).

Dentre as serino proteases, as tripsinas são geneticamente diversas, enzimas essas responsáveis pela digestão, coagulação do sangue, fibrinólise, desenvolvimento, fertilização, apoptose e imunidade. O sucesso dessa diversidade genética é atribuído a um dobramento conformacional altamente eficiente que acopla

a catálise e interações regulatórias e uma plasticidade conformacional (DI CERA, 2009). A regulação dos processos ativados por serino proteases é essencial para as atividades fisiológicas da célula, sendo que a falta de regulação dessas atividades pode levar a condições patológicas. As serino proteases transmembrana tipo II, hepsina, matriptase-2, TMPRSS4 (*transmembrane serine protease 4*), serino protease *urokinase Plasminogen Activator* (uPA), calicreínas e HtrA (*serine protease*) estão intimamente relacionadas as proteases associadas ao câncer, uPA e o sistema de calicreína participam de uma série de funções fisiológicas desde o crescimento celular, sinalização celular até o processo de remodelação tecidual. No entanto, a desregulação da expressão dessas serino proteases leva à invasão do tumor e câncer (PODDAR; MAURYA; SAXENA, 2017).

A tripsina, está envolvida na carcinogênese colorretal e promove proliferação, invasão e metástase (YAMAMOTO *et al.*, 2003; SOREIDE *et al.*, 2006) a atuação da tripsina ocorre direta e indiretamente por meio de um "sistema de protease-antiprotease" e pela ativação de outras cascatas de sinalizações reguladas por proteases. A invasão da membrana basal por células tumorais pode ser promovida pela digestão do colágeno tipo I pela tripsina. A tripsina é ativada e co-expressa com metaloproteases de matriz (MMPs) que são conhecidas por facilitar a invasão e a metástase (NYBERG *et al.*, 2002). MMP-2, MMP-7 e MMP-9 são co-expressas juntamente com a tripsina e parecem ser de particular importância na proliferação, progressão e invasão (RAKASHANDA *et al.*, 2012). As MMPs podem desempenhar um papel na conversão de adenoma em carcinoma e no início da invasão e metástase (RAKASHANDA *et al.*, 2012).

A FIGURA 2 mostra a ação do efeito nocivo da tripsina no ambiente tumoral. A tripsina e o *Proteinase-Activated Receptor 2* (PAR-2) atuam juntos em um controle autócrino que promove a proliferação, invasão e metástase tumoral (RAKASHANDA *et al.*, 2012).

Ativados pela tripsina, MMP e PAR-2 podem ativar as vias MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) através da ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico (DARMOUL *et al.*, 2004; HIROTA *et al.*, 2012).

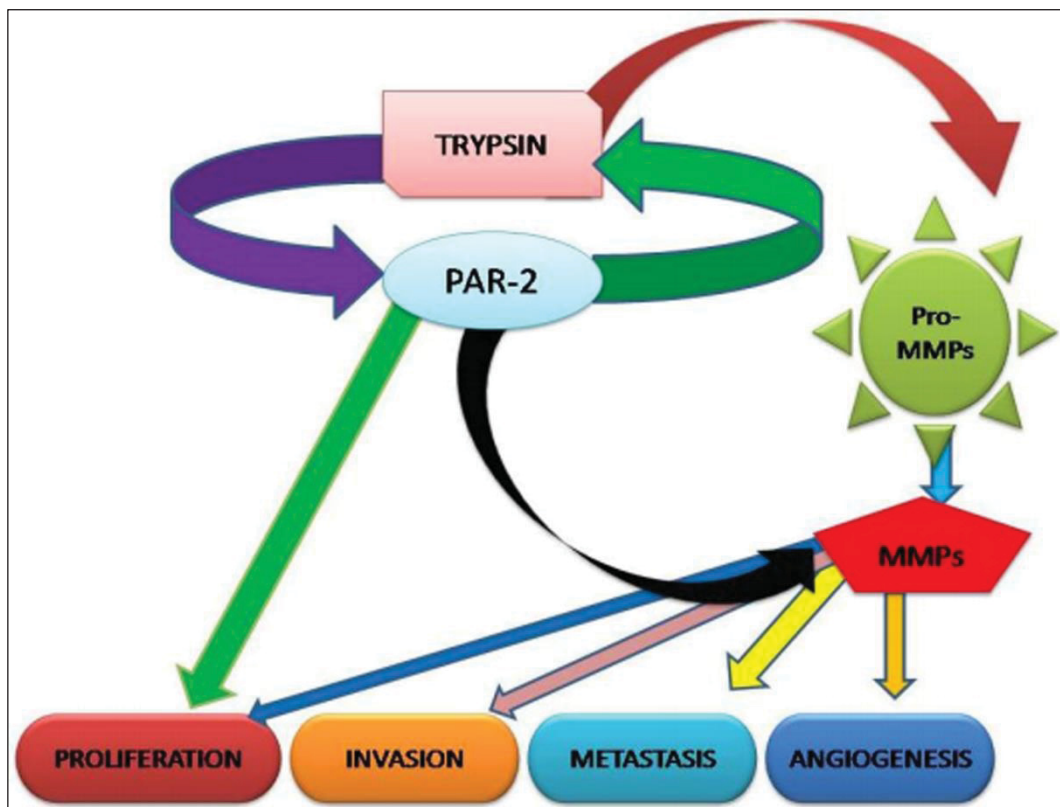
DARMOUL *et al.*, 2004 analisaram as vias de sinalização desencadeadas pela ativação do PAR-2 pela tripsina e a cascata de eventos foram divididas em três partes: 1- Liberação do *Transforming Growth Factor* (TGF)- α por metaloproteína de matriz; 2-

Ativação do *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGF-R) mediada por TGF- α e subsequente fosforilação de EGF-R; 3- ativação de ERK1/2 e subsequente proliferação celular.

As ligações entre esses eventos são demonstradas pelo fato de que a estimulação da proliferação celular e ERK1/2 após a ativação do PAR-2 é revertida pelo inibidor de metaloproteinase *Batimastat* e anticorpos neutralizantes de TGF- α .

Portanto, a transativação de EGF-R parece ser um mecanismo principal pelo qual a ativação do PAR-2 resulta no crescimento de células de câncer de cólon. Esses dados explicam como a tripsina exerce ação nas células do câncer de cólon e mostra o papel crítico da transativação de EGF-R (DARMOUL *et al.*, 2004).

FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO A INTERAÇÃO ENTRE A TRIPSINA E O PAR-2 NA ATIVAÇÃO MMPs



Fonte: (RAKASHANDA *et al.*, 2012).

LEGENDA: PAR-2 (Receptor 2 ativado por proteases). MMPs (Metaloproteinases de Matriz). Pró-MMPs (Metaloproteinases de Matriz inativas).

Hemostasia e fibrinólise, processos biológicos que mantêm o fluxo sanguíneo adequado, são consequência de uma série complexa da cascata de reações enzimáticas, serino proteases envolvidas nestes processos são reguladas por circuitos de *feedback* de moléculas de cofatores e inibidores de serino protease, as serpinas (RAU *et al.*, 2007). O delicado equilíbrio entre as reações proteolíticas e

inibitórias na hemostasia e na fibrinólise, pode ser interrompido, resultando em condições patológicas de trombose ou sangramento anormal (RAU *et al.*, 2007).

O sistema complemento pode ser ativado por meio de 3 vias diferentes: a clássica, das lectinas e a alternativa, que convergem na clivagem e ativação de C3 (Convertase) que leva a atividade de várias moléculas biológicas efetoras. A regulação do sistema complemento é mediada por uma série de substâncias solúveis e proteínas ligadas à membrana. O complemento desempenha um papel fundamental em uma série de processos biológicos, incluindo a defesa do hospedeiro, remoção de células lesionadas e detritos, modulação de processos metabólicos e regenerativos, e a regulação da imunidade adaptativa. A ativação inadequada do complemento e a regulação prejudicada podem levar a doenças e condições relacionadas a doenças (VARELA; TOMLINSON, 2015).

O Sistema complemento é composto por cerca de 50 proteínas séricas e de membrana, com cascatas de ativação proteolítica rigidamente reguladas que culminam na produção de moléculas efetoras com múltiplas funções biológicas (WALPORT, 2001; KEMPER; PANGBURN; FISHELSON, 2014). Dentre essas moléculas há atividade de pelo menos nove serino proteases (SIM; LAICH, 2000). As serino proteases do complemento incluem C1r, C1s, MASP 1 (*Mannose-Binding Lectin* (MBL)-*Associated Serine Protease*), MASP 2, MASP 3, C2, Fator B, Fator D, e Fator I. Cada uma dessas serino proteases tem especificidade restrita e baixa atividade enzimática. O grupo C1r, C1s e MASP ocorrem como pro-enzimas. Quando ativados, são regulados, por uma serpina, inibidora de C1. C2 e Fator B, no entanto, têm regulação complexa múltipla, composta por um grupo de proteínas do complemento chamadas *Regulation of Complement Activation* (RCA) enquanto os Fatores I e D parecem não ter inibidores naturais (SIM; LAICH, 2000).

No veneno de *L. intermedia* foi descrita atividade serino proteásica em ensaios de zimograma que revelaram atividade gelatinolítica de duas moléculas, uma de 85 kDa e outra de 95 kDa após estas serem ativadas pela tripsina. A classificação como serino proteases foi confirmada devido à inibição da atividade proteolítica ocorrer somente por inibidores como aprotinina, PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*), leupeptina, benzamidina e inibidor de tripsina de soja, mostrando que a serina é um resíduo funcional do sítio ativo dessas proteases (VEIGA *et al.*, 2000).

Assim, o veneno de *L. intermedia* contém, pelo menos, duas serino proteases com seletividade de substratos, uma vez que foi constatada atividade frente ao

colágeno desnaturado, baixa atividade frente a caseína e ausência de atividade proteolítica sobre laminina, BSA (*Bovine Serum Albumin*), fibrinogênio, hemoglobina e imunoglobulina G (VEIGA *et al.*, 2000).

4.2.1 Inibidor de serino protease: Serpina

Inibidores de serino proteases são classificados com base na sua sequência primária, estrutura e mecanismos de ligação a seus substratos. São agrupados em três superfamílias de acordo com seu mecanismo de ação: os inibidores canônicos, os inibidores não-canônicos e as serpinas (OTLEWSKI; KROWARSCH; APOSTOLUK, 1999; KROWARSCH *et al.*, 2003). Alguns membros da família das serpinas são de fato inibidores de serino protease, mas vários outros membros têm funções diferentes como por exemplo, inibir cisteíno protease, como as caspases e catepsinas (HUNTINGTON, 2011).

As serpinas são compostas por 350 a 500 aminoácidos e compartilham uma estrutura altamente conservada composta por 3 folhas β e de 7 a 9 α -hélices. A maioria das serpinas tem massa molecular na faixa de 40 a 60 kDa, o que diferencia as serpinas dos outros inibidores de serino protease (BHAKUNI *et al.*, 2016).

Mais de 3.000 serpinas e membros semelhantes a serpinas já foram identificados no genoma de organismos que representam todas as formas de vida, como metazoários, plantas, vírus. Dentre as serpinas já descritas, 36 são serpinas humanas, essas moléculas estão amplamente presentes no plasma e nos tecidos dos seres vivos (LAW *et al.*, 2006; BHAKUNI *et al.*, 2016) bem como, também estão presentes no complexo proteico dos venenos de animais, como serpentes, caracóis, carrapatos, anêmonas do mar, vespas, escorpiões e aranhas (YUAN *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2016; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019).

Em plantas e microrganismos, pequenos inibidores de serino protease canônicos do tipo Kunitz e Kazal são predominantes (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004). Em humanos, as serpinas modulam processos importantes como coagulação sanguínea, inflamação e fibrinólise (HUNTINGTON, 2011) com estrutura e mecanismo de inibição semelhantes a maioria das serpinas inibitórias têm especificidade de múltiplas proteases que é aumentado na presença de cofator à base de heparina, várias serpinas de ligação a heparina envolvidas na coagulação também modulam a angiogênese (SHELLENBERGER *et al.*, 2005; BHAKUNI *et al.*, 2016).

A especificidade de múltiplos alvos das serpinas de plantas, incluindo as serpinas LR (Leucina-Arginina), permite que desempenhem funções duplas, tanto como regulador da morte celular, quanto como uma proteína protetora antipatogênica (COHEN; DAVYDOV; FLUHR, 2019).

Iripin-3, uma serpina expressa nas glândulas salivares do carrapato *Ixodes ricinus* é uma proteína pluripotente, com propriedades imunomoduladoras e anti-hemostáticas que podem facilitar a alimentação do carrapato via a supressão das defesas do hospedeiro (CHLASTÁKOVÁ *et al.*, 2021).

A capacidade das serpinas de sofrerem mudança conformacional é fundamental para a sua função, mas também as tornam suscetíveis a mutações que perturbam o seu dobramento, levando à deficiência e doenças (DAVIES; LOMAS, 2008; HUNTINGTON, 2011; LYSVAND *et al.*, 2015). O distúrbio de deficiência de α -antitripsina é uma das serinopatias hereditárias mais comuns (JANCIAUSKIENE *et al.*, 2011). Mutações em α -1 antitripsina (SERPINA1) levam a enfisema grave com lesão pulmonar, bem como doença hepática e pancreática (JANCIAUSKIENE *et al.*, 2011) e mutações em antitrombina (SERPINA C1) levam a formação de trombos excessivos, causando a trombose (CONARD; SAMAMA, 1986; COLLIER *et al.*, 1987; GETTINS; PATSTON; SCHAPIRA, 1992; CARRELL *et al.*, 1997; ISHIGURO *et al.*, 2000).

O papel inibitório das serpinas é modulado pela ligação a cofatores, especialmente proteoglicanos, heparina e heparan sulfato, presentes nas superfícies celulares e na matriz extracelular. A função inibitória da antitrombina é acelerada pela heparina e essa é a base para o uso extensivo de heparinas terapêuticas para profilaxia e tratamento de complicações trombóticas (REZAIE; GIRI, 2020; STERN *et al.*, 1985).

Bao e colaboradores (2018) estudaram a interação entre serpinas de patógenos e hospedeiros, e evidenciaram que as serpinas do hospedeiro fornecem proteção, e as serpinas dos patógenos aumentam a infectividade, ou seja, a capacidade do patógeno de se alojar e multiplicar-se no corpo do hospedeiro. Pesquisas futuras irão elucidar o valor terapêutico dessa molécula visto que, as serpinas desempenham papéis críticos nas interações patógeno/hospedeiro e na regulação das respostas inflamatórias (BAO *et al.*, 2018). Além disso, inibidores de tripsina possuem inúmeras aplicações como bioferramentas, tais como, proteger as drogas proteicas da clivagem por enzimas no trânsito gastro intestinal usando encapsulamento, ou complexação da

droga com inibidores, Larionova e colaboradores (1999) propõem essa capsulação com a aprotinina, um inibidor de serino protease.

Diferentes produtos sialilados da Serpina A1 foram considerados biomarcadores do líquido cefalorraquidiano para indicar o desenvolvimento da demência na doença de Parkinson (JESSE *et al.*, 2012). Outra aplicabilidade interessante para inibidores de proteases é a inserção de genes que codificam serpinas terem sido introduzidos na lavoura, em culturas de alfafa, batata, algodão e tabaco, aumentando significativamente a resistência destes ao ataque de insetos e predadores (CHRISTELLER; LAING, 2005).

Em análise de transcriptoma de glândulas produtoras de veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* foram encontrados transcritos codificadores de inibidores enzimáticos. A biblioteca de cDNA da glândula de veneno *L. intermedia* mostrou a presença de 0,1% das sequências dos transcritos relacionadas a um inibidor de serino protease (GREMSKI *et al.*, 2010) e no transcriptoma de *L. laeta* foram encontrados 0,6% dos transcritos relacionados a essa mesma função (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

As razões para a presença de inibidores de proteases no veneno animal e os alvos fisiológicos dessas moléculas ainda não são totalmente compreendidos. A expressão de inibidores de serino protease em veneno de serpente indica que há uma pressão seletiva operando nas proteínas do veneno porque funções como neurotoxinas ou inibidores potenciais na cascata de coagulação e fibrinólise, aumentaram a potência dos venenos de serpentes contra diversas espécies de presas (ŽUPUNSKI; KORDIŠ; GUBENŠEK, 2003).

4.2.2 Serpinas com atividade antitumoral

O estudo dos inibidores de serino protease como agentes antitumoral tem sido um importante tema de pesquisa (CASTRO-GUILLÉN; GARCÍA-GASCA; BLANCO-LABRA, 2010).

Um membro em particular da família das serpinas, a maspina, tem sido estudada devido ao seu potencial como um agente terapêutico contra câncer, devido à inibição do crescimento de tumor, angiogênese, invasão, motilidade e metástase bem como, por promover a apoptose (SHENG *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2000; ZOU *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2002). Atividade inibitória da maspina contra a angiogênese

foi mostrada pela primeira vez quando essa molécula inibiu a migração de células endoteliais através da inibição do *Fibroblast Growth Factor* (FGF) e do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) *in vitro*, e bloqueou a neovascularização *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2000). A maspina é regulada epigeneticamente com a expressão tecido-específica relacionada a metilação do DNA (DOMANN *et al.*, 2000). A região promotora do gene da maspina é especialmente importante porque é responsivo a hormônio e com local de ligação a proteína p53. Além disso, a expressão da maspina é regulada por ambas as vias supressoras de tumor, p53 e *Transforming Growth Factor* (TGF)- β (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997; ZOU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2007). A maspina nuclear atua como um regulador da transcrição, interagindo diretamente com fatores transcripcionais (LI *et al.*, 2006).

A serpina 5, secretada por células epiteliais normais, atua como um componente do sistema de vigilância extracelular que facilita a eliminação de células pré-malignas do epitélio (KATSUKAWA *et al.*, 2018).

A forma clivada inativa de antitrombina (C-AT) e outra forma inativa produzida por tratamento térmico, conhecida como forma latente (L-AT), foram relacionadas com a atividade antiangiogênica (O'REILLY *et al.*, 1999). O mecanismo de efeito antiangiogênico de L-AT e C-AT consiste no rompimento das interações célula-matriz, aumento da apoptose, parada do ciclo celular, e inibição do crescimento tumoral e metástase, via alterações na cinase de adesão focal e vias de sinalização de receptor de ligante de célula endotelial (DOOLITTLE, 1983; LARSSON *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2006).

Vários genes importantes são afetados por L-AT e C-AT em células endoteliais, agindo na regulação negativa de genes pró-angiogênicos, incluindo proteoglicanos de superfície celular e de matriz (perlecano, biglicano e sindecanos 1 e 3), transdutores de sinais e ativadores de transcrição, *Signal Transducers and Transcription Activators* (STAT) relacionados à mitogênese, proteínas de sinalização MAPK-3, STAT 2, 3 e 6, bem como, a regulação positiva de genes anti-angiogênicos como p21, caspase 3 e inibidor de metaloprotease 1, 2, 3 (LARSSON *et al.*, 2000; CASTRO-GUILLÉN; GARCÍA-GASCA; BLANCO-LABRA, 2011).

4.2.3 Serpinas com atividade modulatória do sistema complemento

Protozoários parasitas como *Trypanosoma cruzi* são capazes de neutralizar a ativação do complemento (COUVREUR *et al.*, 2008).

No entanto, enquanto no estágio epimastigota do *T. cruzi* encontrado em vetores de insetos são suscetíveis à via alternativa do complemento, os tripomastigotas metacíclicos infecciosos e da corrente sanguínea são resistentes (JOINER, 1988). A evasão do complemento parece ser devido a presença de uma glicoproteína de 160 kDa, que é um homólogo da proteína reguladora do complemento do hospedeiro (DAF) *Decay-Accelerat-ing Factor* (NORRIS *et al.*, 1991). Assim como DAF, essa glicoproteína pode se ligar a C3b e C4b e inibir a cascata do complemento, evitando assim a formação de convertase e a lise do parasita (SACKS; SHER, 2002).

As serpinas participam da regulação do sistema de complemento (BEINROHR *et al.*, 2011). A Serpina G1, inibidor de C1 é uma proteína plasmática que inibe várias proteases do sistema complemento, da coagulação e do sistema fibrinolítico em humanos (CICARDI *et al.*, 2005).

A L-serpina é um dos principais inibidores da ativação do complemento em *Lampetra japonica* por inativação da proteína C1q (WANG *et al.*, 2019).

Duas serpinas de ácaros *Sarcoptes scabiei*, SMSB3 (*Scabies Mite Serpin*) (54 kDa) e SMSB4 (47 kDa) localizados no intestino e nas fezes do ácaro, foram produzidas de forma recombinante, e em ensaios de atividade não inibiram as serino proteases de ácaros, entretanto, inibiram as serino proteases de mamíferos, como por exemplo, a quimiotripsina. A análise funcional detalhada revelou que ambas as serpinas interferiram nas três vias do sistema complemento humano em diferentes estágios de sua ativação. SMSB4 inibiu principalmente as etapas iniciais e progressivas das cascatas, enquanto SMSB3 mostrou efeitos mais fortes no nível da C9, as SMSs mostraram atividade em vários níveis mediando a inibição geral do sistema complemento e, portanto, podem proteger os ácaros de danos intestinais mediados pelo complemento (MIKA *et al.*, 2012).

4.2.4 Serpinas com atividade modulatória da coagulação sanguínea

As vias pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticas são responsáveis por manter o equilíbrio hemostático sob condições fisiológicas. Qualquer desvio dessas

vias resultaria em hipercoagulação levando a doenças potencialmente fatais, como enfarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose da veia porta, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (BRAKUNI *et al.*, 2016). A angiogênese é o processo de surgimento de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes e desempenha um papel crítico no reparo vascular, retinopatia diabética, inflamação crônica e progressão do câncer. Serpinas desempenham um papel fundamental na regulação da angiogênese e da coagulação (BRAKUNI *et al.*, 2016).

Os resultados do estudo de uma serpin expressa nas glândulas salivares do carrapato *Ixodes ricinus* chamada de Iris (*Ixodes ricinus immunosuppressor*) mostraram que, além de ser um fator anti-inflamatório e modulador da resposta imune é também um fator chave na modulação da hemostasia do hospedeiro. A Iris aumentou a adesão plaquetária, a via de coagulação ativada pela fase de contato e os tempos de fibrinólise de maneira dose-dependente indicando que a Iris interrompe a coagulação e a fibrinólise por meio do domínio RCL antiproteolítico (PREVOT *et al.*, 2006).

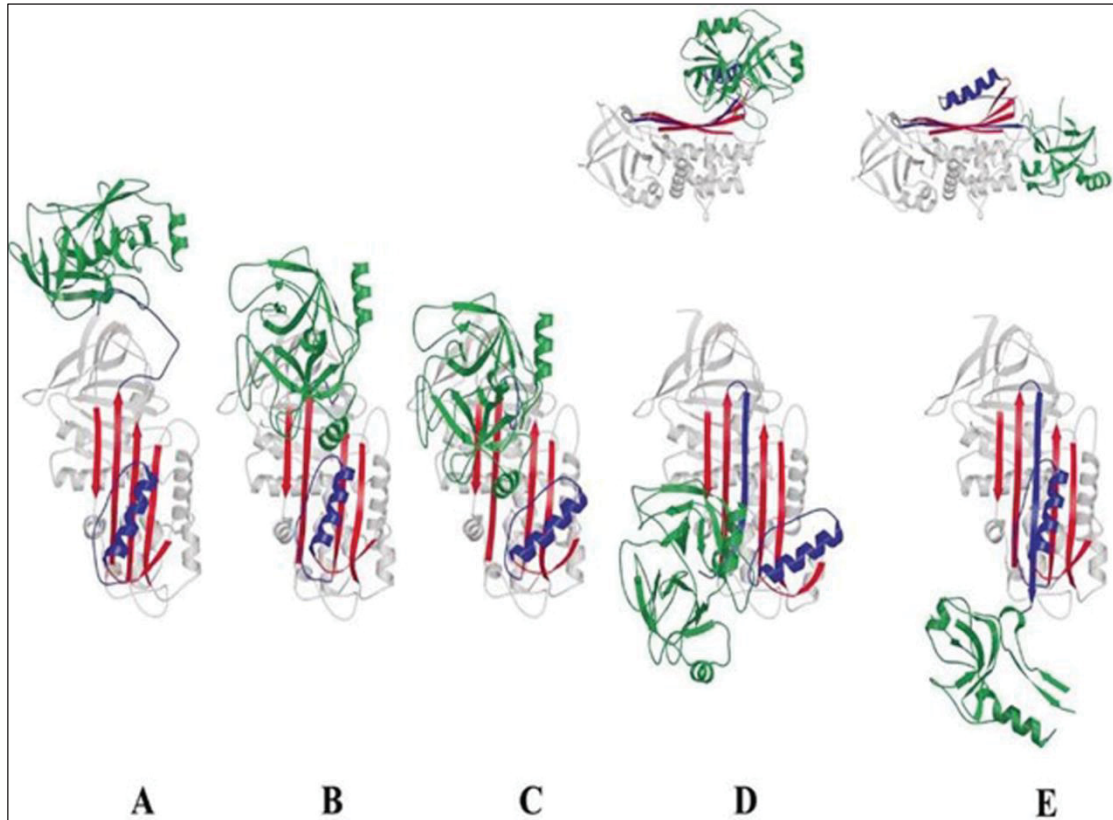
Estudo recente mostrou que, uma serpin Iripin-3 também expressa nas glândulas salivares do carrapato *Ixodes ricinus* inibiu a via extrínseca da coagulação sanguínea (CHLASTÁKOVÁ *et al.*, 2021).

Outra serpin de carrapato da espécie *Ixodes scapularis* (IxscS-1E1) é um inibidor de trombina e de tripsina, inibiu a função de agregação plaquetária e retardou a formação de coágulo de fibrina (IBELLI *et al.*, 2014).

A caracterização bioquímica da serpin 19 de carrapato da espécie *Amblyomma americanum* mostrou que essa proteína tem atividade anticoagulante, inibindo a atividade de cinco dos oito fatores de coagulação do sangue que são serino proteases, preveniu a agregação plaquetária e retardou a coagulação do plasma (KIM *et al.*, 2015). A FIGURA 3 mostra que a serpin 19 inibe a atividade enzimática da plasmina e dos fatores de coagulação sanguínea Xa e XIa, formando complexo irreversível com esses fatores. O fator XIIa é inibido em 82,5%, e os fatores IIa (trombina) e IXa quimotripsina e a triptase respectivamente, são inibidas moderadamente em 14–29% (KIM *et al.*, 2015).

2002).

FIGURA 4 – PAINEL MOSTRANDO AS ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO COVALENTE ENTRE A SERPINA E A SERINO PROTEASE



FONTE: Gettins (2002).

LEGENDA: **A.** Complexo no ponto de clivagem da alça central reativa antes da inserção da alça. Em verde é mostrado a serino protease. **B.** Complexo após os primeiros resíduos do centro reativo terem sido inseridos e exatamente quando a proteinase alcança a hélice-f. **C.** Deslocamento parcial da hélice f (em azul) necessário para permitir a progressão da proteinase (em verde) em direção a região inferior da serpina. **D.** Deslocamento total da hélice f com a remoção da cadeia lateral P1 da proteinase. Acima do painel **D** é uma vista lateral da estrutura **D** para mostrar que a proteinase ainda está "acima" do plano da folha- β A e, não está distorcida. **E.** Complexo final no qual a hélice-f retornou e a proteinase foi distorcida através de compressão contra a região inferior da serpina e foi totalmente inativada. Acima do painel **E** é uma vista lateral da estrutura para mostrar o movimento da proteinase abaixo do plano da folha- β A e contra a região inferior da serpina.

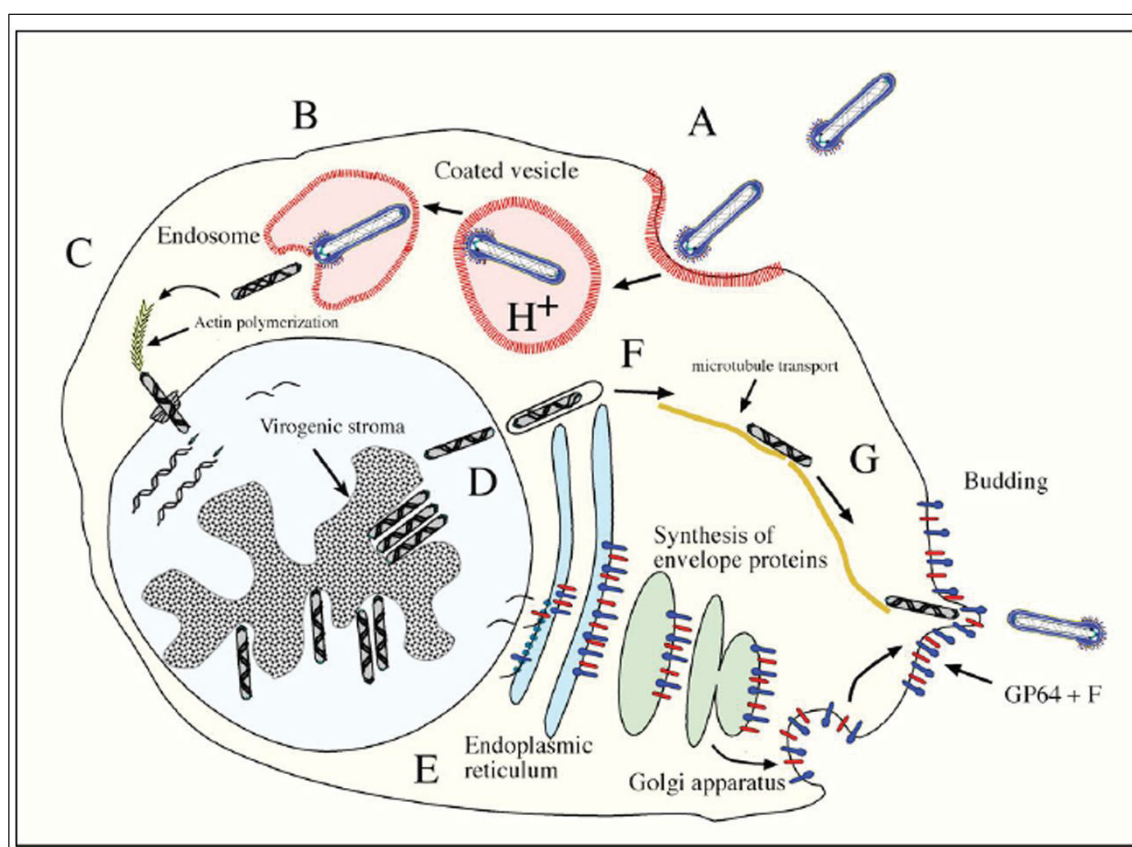
Gremski e colaboradores (2010) identificaram uma sequência codificante de uma serpina no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*, um fragmento com 1197 pares de base. Posteriormente, essa sequência foi clonada e expressa em diversas cepas de *E. coli*, resultando na obtenção da proteína recombinante em sua forma insolúvel (GREMSKI, 2010). Isso se deve provavelmente ao modelo utilizado na expressão ser de procarioto, uma vez que bactérias não possuem sistema de endomembranas, limitando o dobramento correto e modificações pós-traducionais.

4.3 SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVÍRUS/ CÉLULAS DE INSETO

4.3.1 Biologia molecular do baculovírus

Os baculovírus no ambiente natural infectam espécies de Lepidópteros (ROHRMANN, 2013). A FIGURA 5 ilustra a entrada do baculovírus na célula de inseto.

FIGURA 5 – ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO A BIOLOGIA DO BACULOVÍRUS



FONTE: Rohrmann (2013).

LEGENDA: **A.** Os baculovírus ligam-se a receptores e, via proteína gp64, são endocitados. **B.** A vesícula endocítica é acidificada e isso altera a conformação de gp64 e faz com que o envelope do vírion se funda com a membrana endossômica liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. **C.** O nucleocapsídeo entra no núcleo por meio de um complexo de poro nuclear. **D.** Os genes são transcritos, o DNA é replicado e os nucleocapsídeos são montados no estroma virogênico. **E.** Proteínas do envelope são sintetizadas e provavelmente traduzidas em associação com o retículo endoplasmático, glicosiladas, transportadas e incorporadas na membrana citoplasmática utilizando o aparelho de Golgi. **F.** Nucleocapsídeos destinados a se tornarem baculovírus saem do núcleo e recebem um envelope transitório. **G.** As evidências sugerem que eles saem da célula por associação com a proteína motora cinesina, que se move ao longo dos microtúbulos. Ao atingir a membrana citoplasmática modificada pelas proteínas f e gp64, eles obtêm envelopes definitivos.

A tecnologia do baculovírus é datada de 1980, onde o primeiro trabalho ilustrou o potencial uso do baculovírus na produção de proteínas recombinantes em células de insetos, nesse trabalho foi feita a expressão de IFN- β (Interferon humano), como

uma molécula recombinante (SMITH; SUMMERS; FRASER, 1983). Trinta anos após o início do uso desse sistema para a produção de proteínas recombinantes, suas tecnologias associadas formam uma plataforma principal para a produção de proteínas tanto na ciência básica como na ciência aplicada (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

A primeira linhagem celular a ser intensamente utilizada em pesquisas e aplicações tecnológicas foi a Sf21, isolada de tecidos ovarianos de *Spodoptera frugiperda*. A linhagem celular Sf9 é derivada da linhagem Sf21 (SMITH; SUMMERS; FRASER, 1983). Estas células são adaptadas ao crescimento em semiaderência, ou seja, podem ser cultivadas tanto em sistema estático em monocamadas de células, como em suspensão (PALOMARES; ESTRADA-MONDACA; RAMÍREZ, 2006).

Células de inseto necessitam de muitos componentes para o crescimento como, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento, hormônios, lipídeos e vitaminas as taxas de consumo desses nutrientes podem variar de acordo com o estado fisiológico da célula (PALOMARES; ESTRADA-MONDACA; RAMÍREZ, 2006). As células de inseto são adequadas para a expressão de glicoproteínas, e proteínas biologicamente ativas (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015). As células de inseto não infectadas apresentam o núcleo com forma irregular, contendo porções de heterocromatina de vários tamanhos dispersas pelo seu interior, presença massiva de mitocôndrias, projeções citoplasmáticas e algumas vezes, vacúolos fagocíticos (ACÁCIO, 2008).

Durante as seis horas iniciais, após a infecção da célula de inseto por baculovírus, os primeiros efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio eletrônico. Ocorrem alterações no arranjo do citoesqueleto, e a cromatina celular começa a se dispersar no núcleo, que aumenta em volume ocorrendo hipertrofia nuclear (O'REILLY; BROWN; MILLER, 1992).

A próxima fase de infecção ocorre entre 6 e 24 horas após a infecção, quando uma estrutura eletrondensa, o estroma virogênico fica evidente e ocorre replicação de DNA viral (BILIMORIA, 1991). Após 24 horas inicia-se a fase de infecção, quando ocorre a produção de poliedros (O'REILLY; BROWN; MILLER, 1992). Pode-se detectar a presença de poliedros no núcleo da célula infectada e à medida que a infecção progride, estes se acumulam no núcleo, comprimindo o citoplasma.

Estruturas fibrilares, formadas pela proteína viral P10, surgem tanto no núcleo como no citoplasma (VAN DER WILK; VAN LENT; VLAK, 1987). Estudos da cinética de síntese proteica mostram que a partir dessa fase há um bloqueio na síntese de

proteínas celulares. As proteínas virais P10 e poliedrina são predominantemente sintetizadas até 72 horas após a infecção (O'REILLY; BROWN; MILLER, 1992).

A proteólise pode afetar a qualidade e quantidade do produto da expressão e é em grande parte devido à natureza deste sistema, que é lítico. Proteases podem ser produzidas pelas células de inseto após a infecção por baculovírus como resposta ao estresse durante o ciclo de infecção ou podem ser liberadas após a lise celular como, por exemplo, as proteases lisossômicas. O problema da proteólise pode ser ainda mais exacerbado em sistemas de cultura sem soro, onde a proteção conferida por proteínas séricas, como albumina e macroglobulina estão ausentes (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

Os baculovírus recombinantes podem ser amplificados em culturas com monocamada celular, ou agitação (células em suspensão). O protocolo feito com agitação é mais conveniente e pode ser executado colocando-se culturas de tamanho variável, até cerca de 1,5 litros, em uma plataforma de agitação, em uma incubadora, ou numa sala quente a 28 °C. Para agitar culturas é importante o uso de meio isento de soro para evitar formação de espuma ou bolhas que destroem as membranas celulares e uma área de superfície maior para relação de volume e troca de gases eficiente, porque células infectadas por vírus exigem altos níveis de oxigênio (IRONS *et al.*, 2018). A variação do tempo de incubação das células infectadas mostra que a expressão máxima é alcançada 48h após a infecção. A presença de 2% de SFB no meio de cultura aumenta a produção da proteína recombinante (MOUREZ *et al.*, 2007).

As proteínas expressas utilizando o sistema Baculovírus/células de inseto são facilmente purificadas e possuem potencial biotecnológico diverso para uso na pesquisa, diagnóstico e na produção de fármacos e vacinas (MOUREZ *et al.*, 2007; VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015; NASIMUZZAMAN; VAN DER LOO; MALIK, 2018). Ainda, outra característica importante descrita para esse sistema de expressão é sua maior eficiência na aquisição de proteínas com dobramentos corretos porque as células de inseto são adequadas para a expressão de proteínas biologicamente ativas e imunogênicas (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

A utilização de modelos de expressão eucarionte é um exemplo de metodologia alternativa para a expressão da serpina recombinante de *L. intermedia* com o objetivo de obtê-la de forma solúvel. O sistema de expressão de baculovírus/células de inseto provou ser uma ferramenta extremamente valiosa para a produção de proteínas recombinantes (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; JAYAKUMAR, 2004;

KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005; SHI; JARVIS, 2007; VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular Sf9 (Invitrogen, Waltham, EUA), derivada do tecido ovariano pupal da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, foi utilizada na expressão do LSPILT (do Inglês *Loxosceles Serine Protease Inhibitor-Like Toxin*). O meio de cultura de células Sf-900™ II SFM (Gibco®) foi usado para o crescimento e manutenção das células, bem como para a expressão da LSPILT. *Grace's Insect Medium* (Gibco®) suplementado e não suplementado, foram usados durante o período de transfecção. Os antibióticos utilizados foram penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Gibco®). As células foram mantidas entre 27 e 28 °C em monocamada ou suspensão, dependendo do procedimento, sem umidificação ou atmosfera de CO₂.

A linhagem celular de melanoma murino B16-F10 foi usada para os ensaios de migração *in vitro* e viabilidade. As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 40 mg/L de gentamicina (Inlab, São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂.

5.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA A REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA: 5'RACE e 3'RACE

Com o intuito de obter o segmento de cDNA específico para o inibidor de serino protease, o RNA total extraído das glândulas de veneno de *L. intermedia* foi submetido a reações de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa). Para as reações de 3'RACE, foram adicionados em um microtubo para PCR 0,2 µM de oligonucleotídeo adaptador Oligo (dT)₁₇, 1 µg de RNA total e água DEPC tratada completando volume final de 10 µL em seguida a reação foi incubada a 70 °C por 5 min em termociclador (My Cycler – Thermal Cycler BioRad). Após a incubação para a desnaturação do RNA, a solução foi imediatamente retornada ao gelo. Foi adicionado tampão para transcriptase reversa (1X), 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 20 U de inibidor de RNase e água DEPC tratada para completar o volume

final de 10 µL. Essa nova solução foi colocada no termociclador a 42 °C para anelamento do oligo-DT. Após 1 min, foi adicionado 200 U da transcriptase reversa e os microtubos foram submetidos aos ciclos de 25 °C/5 min, 42 °C/60 min, 70 °C/10 min e 4 °C/∞ (ciclo de espera). Para o ensaio de 5'RACE foi utilizado o oligonucleotídeo específico para síntese do cDNA. O cDNA foi precipitado com acetato de amônio (2,5 M) e etanol absoluto gelado (3:1 v/v de amostra). A mistura foi incubada a -20 °C, por 30 min. Em seguida, foi realizada centrifugação a 4 °C, 20.000 x g por 30 min. Depois de descartar o sobrenadante, o pellet foi lavado com 750 µL de etanol 70% gelado. A centrifugação foi nas mesmas condições da anterior, por 5 min. O material sedimentado foi ressuspensão em 20 µL de água.

Para a realização de 5'RACE, foi realizada uma reação para a adição de uma cauda de poliadeninas ao cDNA para o anelamento dos oligonucleotídeos na etapa seguinte. Doze microlitros do cDNA ressuspensão em água, juntamente com tampão para a enzima TdT (desoxinucleotídeo transferase) (1X) e dATP 0,2 mM foram incubados a 94 °C por dois minutos. A amostra foi então imediatamente colocada em gelo após essa incubação e foram adicionados 20 U da TdT para um volume final de 20 µL e incubado a 37 °C por 10 min e 65 °C por mais 10 min. Para a reação de PCR propriamente dita, foram utilizados 10 µL do cDNA obtido na reação anterior; tampão para *Taq* DNA polimerase 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs mix 0,2 mM; "Oligonucleotídeo Sense" 0,2 µM; "Oligonucleotídeo Anti-sense" 0,2 µM (esses oligonucleotídeos variam nas diferentes reações realizadas); *Taq* DNA polimerase 1,25 U para um volume final de reação de 50 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador: 94 °C/2 min (1 ciclo); 94 °C/30 s, temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos/30 s, 72 °C/1 min (35 ciclos); 72 °C/10 min (1 ciclo); 4 °C/∞. 3'RACE (5' GTC CAG CTT TGA GCT ACA ATG G 3') e dois oligonucleotídeos anti-sense para a reação de 5' RACE (5' AAT CTT CCG CTT GTA AGT GCC CTG 3'; 5' GAG TGC TTC TTC AAA CTG GCG TG 3').

5.2.1 Extração dos fragmentos do gel de agarose

A análise do produto de PCR foi realizada em eletroforese de gel agarose 1,5% com brometo de etídio 0,5 µg/mL, em tampão TAE (Tris base 40 mM/ acetato 20 mM/ EDTA 1 mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5 V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens *Chemidoc* – XRS e software *Quantity One* – SW (BioRad). O gel de agarose foi

recortado com auxílio de bisturi no local de visualização das bandas correspondentes. Os fragmentos de gel foram colocados em microtubos e o DNA foi extraído com auxílio de kit conforme orientação do fabricante, para extração de DNA em gel (*Gel Band Purification kit*, GE®). O fragmento, como inserto isolado, foi clonado em vetor de armazenamento pGEM-T. Esta fase inicial descrita até aqui foi realizada por outros membros do grupo de pesquisa, antes do início desse trabalho. Portanto, foi necessário confirmar as características, a qualidade e a fidelidade do material. Para tanto, foram feitas reações de digestão, reações de PCR e o sequenciamento dos produtos de PCR e das construções. Assim, em um primeiro momento, duas construções pGEM-T + serpina (numeradas como 26 e 37), foram amplificadas por PCR utilizando diferentes combinações de *primers* que reconheçam tanto sequências do vetor quanto da serpina. Além disso, foi feita uma digestão da construção nº 37 com a enzima NdeI para confirmar, após corrida em gel de agarose, se a altura da banda correspondia ao número de bases esperado para uma construção pGEM-T + serpina. Finalmente, para confirmar a sequência da serpina clonada, o inserto foi sequenciado com os *primers* T7 e SP6.

5.3 REAÇÃO DE DIGESTÃO DA CONSTRUÇÃO DA SERPINA CLONADA EM pGEM-T

Para a reação de digestão da construção da serpina clonada em pGEM-T foi usado 0,5 µg do DNA molde, 2 µL de *buffer orange*, 1 µL de enzima NdeI e água estéril, o volume final da reação foi de 20 µL. O tubo foi incubado por 16 h a 37 °C. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

5.4 REAÇÕES DE PCR

Para as reações de PCR foram usados de 20 a 30 ng do DNA molde do inserto e de 150 a 200 ng do DNA molde da construção, 5 µL de tampão da enzima, 0,5 µL de Pfu DNA polimerase, 0,2 µM de dNTP mix, 0,4 µM de *primer forward* e *reverse* e água estéril. A reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 95 °C/2 min; 95 °C/30 s; 57,7 °C/ 30 s; 72 °C/3 min (40 ciclos); 72 °C/5min; 4 °C/∞.

5.5 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE

Após confirmada a sequência da serpina, foi realizada uma PCR utilizando a enzima *Pfu* DNA polimerase para amplificação do inserto. O *primer forward* foi desenhado com uma região adicional CACC, antes do início do peptídeo sinal da serpina, sendo que essa região é de adaptação ao vetor pENTR™/D-TOPO® (5'-CACCATGTTTTTCTTCAACGAACTG-3'). O *primer reverse* foi desenhado para não ter o códon de parada, de modo que as tags C-terminal (tags de fusão V5 e 6xHis) foram expressas (5'- TTTCCATTGTGGATCAACCACTC-3'). O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a integridade, a banda foi extraída do gel com a utilização do kit *Purelink™ chick gel extraction* (Invitrogen). Parte desse produto de PCR foi usado para sequenciamento pelo método de Sanger para confirmar a inserção da sequência adicional de adaptação ao vetor de clonagem e parte desse produto de PCR foi usado no procedimento de clonagem.

5.6 REAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), com um volume total de reação de 10 µL. Destes, 3 µL são o reagente *Big Dye* e os outros 7 µL são a somatória do volume de DNA molde, oligonucleotídeo e água estéril. Cada clone em pGEM-t foi submetido a duas reações de sequenciamento, uma utilizando o iniciador universal sense T7 e outra o iniciador universal antisense SP6. Para os insertos foram usados iniciadores que adicionaram a região CACC à serpina para a clonagem no vetor pENTR™/D-TOPO® (5'CACCATGTTTTTCTTCAACGAACTG-3' *forward* e 5'-TTTCCATTGTGGATCAACCACTC-3' *reverse*). Após a reação de clonagem descrita abaixo, uma amostra foi sequenciada, com iniciadores que anelam no vetor pENTR™/D-TOPO® (M13 *forward* 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 *reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Após a reação de recombinação descrita na metodologia, uma amostra também foi sequenciada com iniciadores que anelam no DNA viral (Poliedrina *forward* 5'-AAATGATAACCATCTCGC-3 e V5 *reverse* 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3). Essas reações foram levadas em termociclador de placa a 95 °C/20 min, 50 °C/15 s, 60 °C/4 min (35 ciclos); 4 °C/∞. Para a precipitação do produto a ser sequenciado, adicionou-se acetato de sódio/EDTA (1,5

M/0,25 M) (1/10 do volume inicial da reação) em seguida etanol absoluto gelado (3 vezes o volume da reação), homogeneizou-se bem e foi incubado em gelo por 10 min. Em seguida foi centrifugado a 4 °C por 20 min a 20.000 xg. Após retirar o sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado (500 µL), passando o líquido pelo sedimento sem homogeneizar, e em seguida centrifugado por 10 min, 20.000 xg a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi seco em temperatura ambiente dentro do fluxo laminar por 15 min, evaporando completamente o etanol, que pode interferir no sequenciamento. Finalmente, o produto foi ressuspenso em formamida. O sequenciamento foi realizado em sequenciador por eletroforese capilar 3500 xL *Genetic Analysers* (Applied Biosystems® 3500) e os resultados analisados em software *Chromas Pro version 1.5*. O alinhamento e análise das sequências adquiridas foi realizado utilizando o programa Clustal <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>; a sequência mais representativa escolhida foi analisada por comparação ao banco de dados disponível usando a ferramenta nucleotide blast BLAST<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.4.13.

5.7 PROCEDIMENTO DE CLONAGEM/TOPO®

A sequência foi clonada no vetor pENTR™/D-TOPO® entre os sítios de reconhecimentos *attR1* e *attR2* característicos do Sistema *Gateway* (Invitrogen). O produto da PCR foi ligado direcionalmente pela adição das quatro bases do *primer forward* (CACC), que é complementar à sequência *overhang* do vetor de clonagem (GTGG) e, portanto, anela com a região excedente do produto de PCR, proveniente da região extra do *primer forward* e estabiliza o produto na direção correta. A reação acontece devido à enzima topoisomerase I clivar a ligação fosfodiéster de uma fita e conservar a energia pela formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e um resíduo tirosil da topoisomerase (informações do fabricante). Para esta reação foram adicionados 9,4 ng do produto de PCR, 1 µL de *salt solution*, 1 µL do vetor pENTR™/D-TOPO®, e 3 µL de água estéril, e a amostra foi suavemente misturada e incubada em temperatura ambiente, entre 22 e 23 °C. A amostra seguiu para transformação em *E. coli*.

5.7.1 Transformação em *E. coli* quimicamente competente

A transformação da construção da serpina ligada ao vetor pENTR™/D-TOPO® foi feita em *E. coli One Shot® Top 10*, quimicamente competente. Foram adicionados 2 µL da reação de clonagem TOPO® em um frasco de *One Shot®* e incubado no gelo por 1 min e 30 s. Em seguida, a amostra foi submetida a um choque térmico por 30 s a 42 °C, em banho maria e imediatamente o tubo foi transferido para gelo por 1 min e 30 s. Para a recuperação das células foram adicionados 250 µL de meio de cultura S.O.C. (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM) em temperatura ambiente e incubado por 37 °C durante 1 h sob agitação. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-água contendo 100 µg/mL de sulfato de Canamicina (Gibco™). A placa foi incubada *overnight*, em temperatura de 37 °C. Os clones transformados foram utilizados para confirmação da presença do vetor contendo o inserto. Para essa confirmação foi feito PCR de colônia, os clones positivos foram submetidos à minipreparação e sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.

5.7.2 Reação de recombinação

Primeiro dia do preparo da reação de recombinação: Para reação de recombinação, foi adicionado em tubo cônico 150 ng de DNA molde do produto da minipreparação descrita anteriormente que foi eluída em tampão T.E. (pH 8.0 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), adicionado 4 µL da enzima Clonase® II, 10 µL do DNA do baculovírus (300 ng) *BaculoDirect™ C-Term Transfection*, sem pipetar *up and down* ou vórtexar o tubo, para não danificar as moléculas longas do DNA viral. Para completar o volume final de 16 µL foram adicionados 2 µL de tampão T.E. e incubado por 16 h em temperatura de 25 °C em banho maria. Segundo dia do preparo da reação de recombinação: Foram adicionados 10 µL da primeira reação em outro tubo de 1,5 mL e adicionados 100 µL de *Grace's Insect Medium* não suplementado (tubo A). No tubo B foram adicionados 100 µL de *Grace's Insect Medium* não suplementado e 8 µL de Cellfectin® II. Em seguida, foi adicionado o conteúdo do tubo A no tubo B cuidadosamente e incubado por 30 min à temperatura ambiente.

5.7.3 Preparando as células para a transfecção

Para a transfecção, as células Sf9 foram cultivadas em garrafa de 75 cm² em meio de cultura Grace's suplementado e contendo 10% de SFB, sem antibiótico e em fase de crescimento logarítmico entre 1,5-2,5 x10⁶ cél/mL e com viabilidade superior a 95%.

5.7.4 Transfecção

Foram plaqueadas 8x10⁵ cél/poço em placa de seis poços em 2 mL de meio *Grace's*, não suplementado, sem antibióticos e sem SFB. As células aderiram por 40 min na incubadora a 27 °C, em seguida foi realizada a transfecção, adicionando gota a gota o total de 210 µL da reação de recombinação nas células, no mesmo meio em que foram plaqueadas. As células transfectadas foram incubadas a 27 °C por 5 h, e em seguida o meio da transfecção foi substituído por 2 mL de *Grace's Insect Medium*, suplementado e com 10% SFB, com 100 µM de ganciclovir. A placa foi mantida em câmara úmida e incubada à 27 °C por 168 h. Este foi considerado o P0, P zero da produção viral. O sobrenadante das células transfectadas foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min e armazenado a 4 °C protegido da luz.

5.8 PRIMEIRO ESTOQUE VIRAL (P1)

Para o início da expansão viral foi feito o primeiro estoque viral (P1). Para tanto, nesta fase, as células foram plaqueadas (8x10⁵ células por poço) em placas de seis poços em 1,5 mL de meio de cultura Sf-900™ II SFM com 100 µM de ganciclovir, sem SFB, com uma viabilidade celular mínima de 95%. As células foram incubadas por 1 h para permitir a total aderência no fundo da placa formando uma monocamada celular, e, após este período, foram adicionados 500 µL do sobrenadante (P0). A incubação foi feita em câmara úmida a 27 °C, por 144 h, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min, e armazenado a 4 °C protegido da luz.

5.8.1 Segundo estoque viral (P2)

O segundo estoque viral (P2) foi feito em garrafa de 25 cm² em 5 mL de meio

Sf-900™ II SFM, sem SFB, com uma confluência celular de 80% e viabilidade mínima de 95%. As células foram incubadas por 1 h para permitir a total aderência no fundo da garrafa formando uma monocamada celular. Após este período, foi adicionado 1 mL do sobrenadante (P1). As células ficaram em incubadora a 27 °C, por 144 h, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min e armazenado a 4 °C protegido da luz.

5.8.2 Terceiro estoque viral (P3)

O terceiro estoque viral (P3) foi feito em garrafa de 75 cm² em 10 mL de meio Sf-900™ II SFM, sem SFB, com uma confluência celular de 80% e viabilidade mínima de 95%. As células foram incubadas por 1 h, para permitir a total aderência no fundo da garrafa formando uma monocamada celular. Após este período foram adicionados 2 mL do sobrenadante (P2). As células ficaram em incubadora a 27 °C, por 144 h, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min e armazenado a 4 °C protegido da luz.

5.8.3 Quarto estoque viral (P4)

Como estratégia para garantir que a titulação viral estaria sendo amplificada de forma exponencial foi feito um quarto estoque viral (IRONS *et al.*, 2018). O quarto estoque viral (P4) foi feito em garrafa de 75 cm², em 10 mL de meio Sf-900™ II SFM, sem SFB, com uma confluência celular de 80% e viabilidade mínima de 95%. As células foram incubadas por 1 h para permitir a total aderência no fundo da garrafa formando uma monocamada celular. Após este período foram adicionados 3 mL do sobrenadante do P3. As células ficaram em incubadora a 27 °C por 144 h, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min e armazenado a 4 °C protegido da luz.

Amostras do estoque viral P3 e P4 foram usadas para o isolamento do material genético, que foi submetido a quantificação da carga viral por PCR em tempo real (*rt-qPCR titration kit*) SYBR™ Green reagent (Applied Biosystems).

5.8.4 Isolamento do DNA para titulação viral

Foram adicionados 750 µL do meio de cultura condicionado do terceiro e quarto estoque viral em tubos de 1,5 mL em seguida adicionados em cada tubo 750 µL de PEG 8000 20% diluído em NaCl 1 M. Os tubos foram invertidos 2 vezes e incubados por 30 min a 25 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min, e o sobrenadante completamente removido com auxílio de pipeta. Depois, foi adicionado, sem pipetar *up and down*, tampão de lise (triton 0,1% diluído em PBS 1X). A seguir foram adicionados 10 µL de proteinase K em cada tubo e incubado por 1 h a 50 °C. Então, foram adicionados 110 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:25:1), e invertido os tubos duas vezes. Centrifugou-se por 5 min à 25 °C, em seguida a parte aquosa foi transferida para outros tubos de 1,5 mL, onde foi adicionado acetato de sódio 3 M 10 µL, glicogênio ultrapuro 0,5 µL e 250 µL de etanol 100% em cada tubo e incubado a -20 °C, por 20 min e após centrifugado por 15 min a -4 °C. Foi enfim, feita lavagem com etanol 70%, centrifugado e o etanol todo removido. Os tubos ficaram abertos em fluxo laminar até estarem completamente secos e em seguida adicionados 10 µL de água estéril.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DA TITULAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR

Para a titulação viral foi feita uma curva de calibração em duplicata. Foi usado *SYBR™ Green reagent (Applied Biosystems)*, um agente inespecífico que revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. Para controle negativo foi usado meio condicionado de células que não foram transfectadas. Foram usados 0,4 µM de *primer forward* e *reverse*, específicos para GP64, que amplificam um gene da glicoproteína do capsídeo do baculovírus. Foi adicionado 1 µL da amostra em cada tubo do DNA que foi extraído dos sobrenadantes P3 e P4. As reações de RT-pPCR foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C/30 s; 95 °C/30 s; 60 °C/25 s; 95 °C/15 s (40 ciclos); 60 °C/1 min 95 °C/15 s.

5.10 PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SERPINA RECOMBINANTE EM MODELO EUCARIOTO

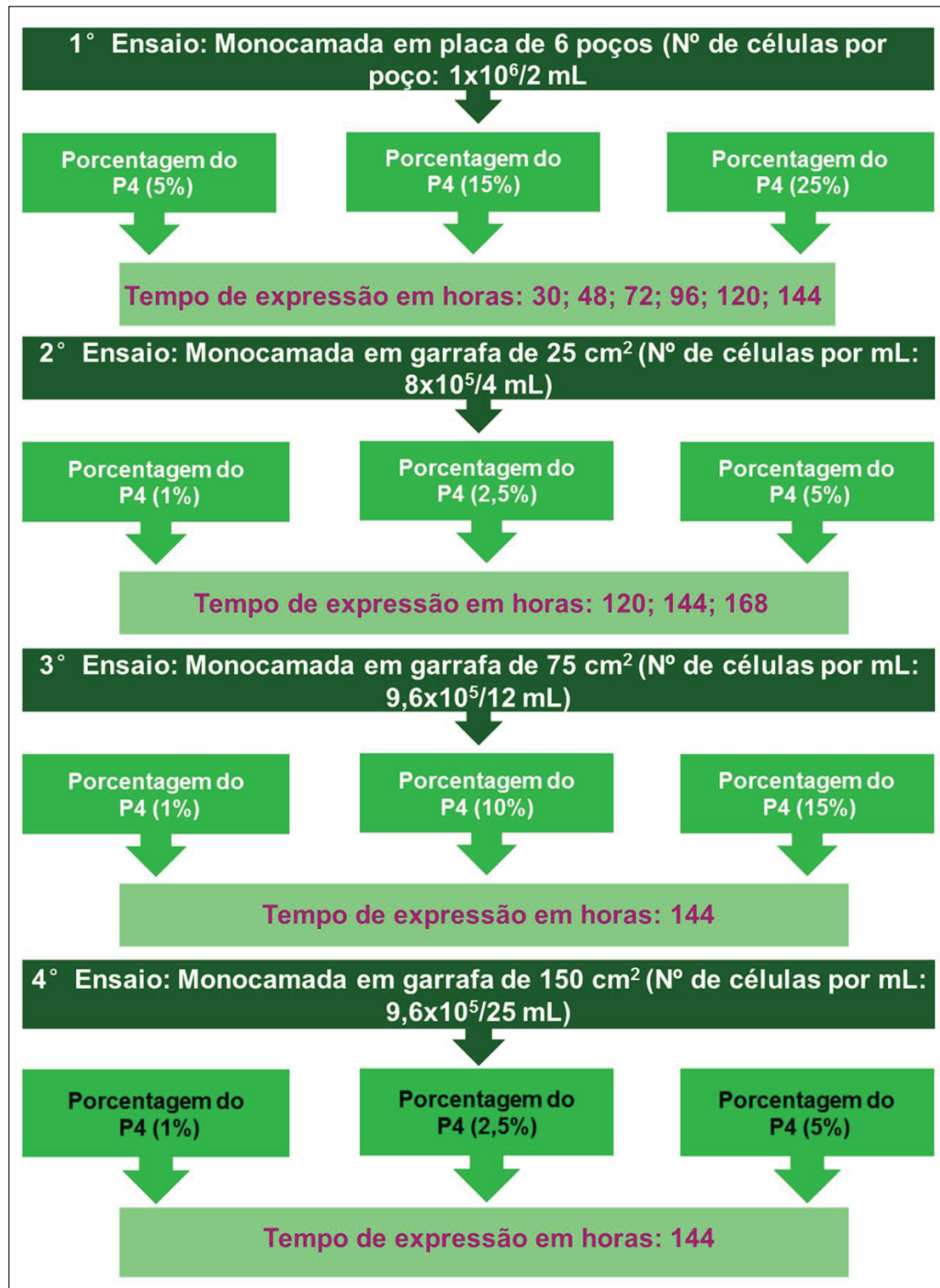
O meio de cultura utilizado para a manutenção das células Sf9 e para a

expressão da serpina recombinante foi o Sf-900™ II SFM (Gibco®).

Antes da produção da serpina recombinante em volumes maiores, foram feitos ensaios de padronização da expressão em volumes reduzidos em monocamada e em suspensão de células para verificar a melhor *multiplicity of infection* (MOI) e o melhor tempo de expressão para obter a serpina recombinante na forma solúvel e na conformação de dobramento correto. Os ensaios de padronização da titulação viral, número de células e volume de expressão foram organizados nos fluxogramas 1 e 2 (FIGURAS 6 e 7).

A FIGURA 6, mostra no fluxograma 1, as condições padronizadas de: tempo e volume de expressão, número de células e porcentagem do volume do sobrenadante (P4) de alta titulação viral, em ensaios feitos em monocamadas de células.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA 1: TESTES DE PADRONIZAÇÕES DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADA



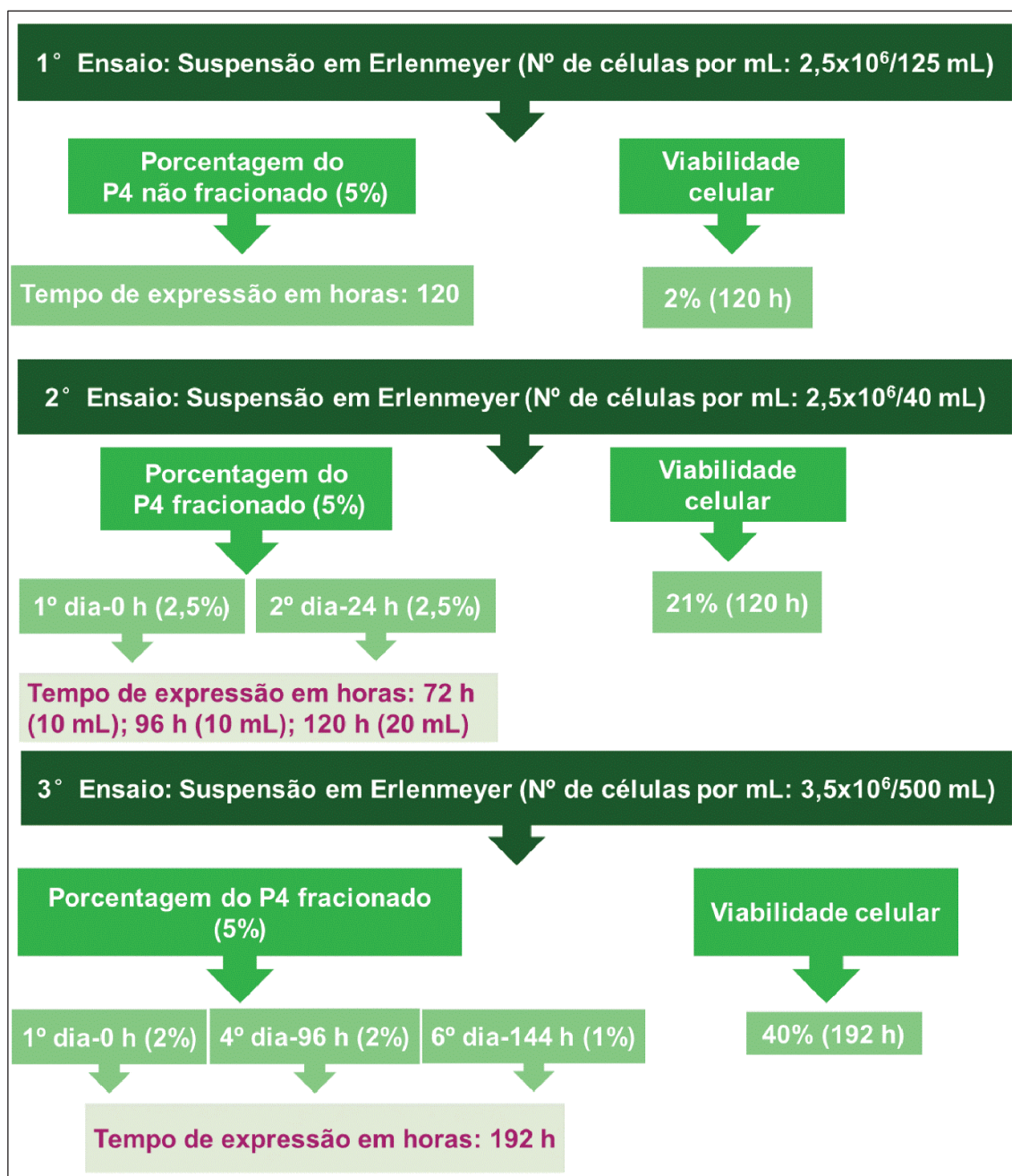
FONTE: A autora.

LEGENDA: Padronização do tempo de expressão, número de células em monocamada e porcentagem do título viral.

A FIGURA 7, mostra no fluxograma 2, as condições padronizadas de: tempo e

volume de expressão, número de células e porcentagem do volume do sobrenadante (P4) de alta titulação viral, em ensaios feitos com células em suspensão.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA 2: TESTES DE PADRONIZAÇÕES DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS CULTIVADAS EM SUSPENSÃO



FONTE: A autora.

LEGENDA: Padronização do tempo de expressão, número de células em suspensão e porcentagem do título viral.

Todos os volumes dos ensaios de padronização da expressão feitos em monocamadas de células (FIGURA 6) e os ensaios 1 e 2 da (FIGURA 7), expressão em suspensão, foram concentrados em concentrador a vácuo ou concentrados por

membranas (Amicon®) corte de 10 kDa, para um volume final de no máximo 2 mL. As amostras concentradas foram submetidas a testes para detecção da presença da toxina recombinante por *immunoblotting* e testes de atividade biológica por zimograma reverso. O ensaio 3 da (FIGURA 7) seguiu para purificação por cromatografia de afinidade em sistema automatizado.

5.11 PURIFICAÇÃO

A purificação da serpina recombinante foi feita em sistema automatizado ÄKTA pure™ (GE Healthcare Life Sciences Marlborough, EUA) por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA, a coluna usada foi a Histrap™ Excel de 1 mL obtida da GE Healthcare Life Sciences (Marlborough, EUA). Foram usados dois tampões para a purificação, sendo tampão A (250 mM de NaH₂PO₄ e 2,5 M de NaCl). Tampão B (250 mM de NaH₂PO₄, 2,5 M de NaCl e 500 mM de imidazol). O tampão B foi usado na eluição da amostra. O grau de pureza do eluato foi analisado por eletroforese em gel de acrilamida, SDS-PAGE 12,5%, sob condições redutoras.

5.12 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

As amostras purificadas tiveram sua concentração determinada pelo método de Bradford (*Coomassie Blue*, BioRad, Hercules, EUA) (BRADFORD, 1976). Após a quantificação, amostras de 5 µg de LSPILT purificada foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados com corante *Coomassie Blue* R-250 (BioRad). Para o *immunoblotting*, as amostras contendo 5 µg da proteína recombinante foram submetidas a SDS-PAGE, 12,5% sob condições redutoras e transferidas para membranas de nitrocelulose usando o sistema Trans-Blot® SD (15 V por 30 min). Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas por 2 h em PBS-BSA 3% em temperatura ambiente sob agitação constante. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 h em soro pré-imune (1:1500) ou antissoro contra a serpina recombinante (1:1500), antissoro que reconhece o veneno total de *L. intermedia* (1:1500), antissoro que reconhece o veneno total de *L. gaucha* (1:1500) ou antissoro que reconhece o veneno total de *L. laeta* (1:1500). Os anticorpos primários anti-6X-His-tag (1:1500) (Abcam, Cambridge, UK) e anti-V5-tag (1:1500) (Abcam)

também foram usados para detectar a serpina recombinante. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas em temperatura ambiente por 1 h, com solução contendo anticorpos secundários IgG anti-coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:5000), ou IgG anti camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:5000); os anticorpos secundários foram diluídos em solução de bloqueio. As reações foram desenvolvidas utilizando como substrato os reagentes BCIP/NBT(Promega).

5.13 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

O soro hiper imune que reconhece a serpina recombinante foi produzido usando dois camundongos de acordo com Harlow e Lane (1988). Camundongos suíços adultos pesando aproximadamente 50 g foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Foi realizada inicialmente a coleta do soro pré-imune, por via subcutânea pela veia auricular, e em seguida foram administrados nos animais por via intraperitoneal 20 µg de serpina recombinante emulsificada em hidróxido de alumínio (Sigma Aldrich), que foi utilizado como adjuvante. Duas imunizações de reforço adicionais de 40 e 80 µg de serpina recombinante foram administradas em intervalos de 3 semanas. Amostras de sangue foram coletadas 15 dias após a terceira imunização, e a presença de anticorpos policlonais que reconhecem a serpina recombinante foram analisados por *immunoblotting*. O título do soro hiper imune foi avaliado por ensaio de ELISA.

Soros hiper imunes que reconhecem as toxinas do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram produzidos em coelhos. Os coelhos adultos da Nova Zelândia pesando 3 kg foram adquiridos da Fazenda Experimental Canguiri da Universidade Federal do Paraná e mantidos no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Após a coleta do soro pré-imune, cada animal recebeu imunizações iniciais intramuscular e subcutânea de 15 µg do veneno específico total emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). Três outras imunizações de reforço de 30, 40 e 100 µg de veneno total emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) foram administradas em intervalos de 3 semanas. Amostras de sangue foram coletadas 21 dias após a última imunização, e a presença de anticorpos policlonais que reconhecem as toxinas de veneno total foi analisada por *immunoblotting*. O sangue foi coletado e armazenado em tubo de vidro, mantido a

37 °C por 2 h para retração do coágulo e posterior separação do soro por centrifugação (10 min a 3000 rpm). As amostras dos soros foram mantidas a -20 °C.

Os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram gentilmente cedidos pelo CPPI. Todos os protocolos experimentais com animais foram realizados de acordo com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob parecer número 1146 (Anexo 4).

5.14 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Os ensaios de ELISA foram feitos usando 10 µg/mL da serpina recombinante purificada para sensibilizar o fundo da placa (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Dinamarca) (100 µL por poço, por 16 h a 4 °C em câmara úmida). Na sequência a placa foi lavada com PBS 1X (200 µL) e bloqueada com solução de bloqueio (PBS-BSA 3%, 200 µL por poço, durante 2 h em temperatura ambiente). Em seguida os poços foram lavados 5 vezes com 200 µL de PBS-TWEEN-20 0,1%. Após as etapas de lavagem com PBS 1X, os poços da placa foram incubados por 2 h em temperatura ambiente, com 100 µL de um dos seguintes anticorpos primários: antissoros que reconhecem os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho*, ou soros pré-ímmunes (diluições 1:500, 1:1000, 1:2000) diluídos em PBS-TWEEN-20 0,1%. A seguir, as placas foram lavadas com 200 µL de PBS-TWEEN-20 0,1% e então incubadas com 100 µL de anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5000) (Sigma-Aldrich) por 1 h, em temperatura ambiente, diluído em PBS-TWEEN-20 0,1%. A reação colorimétrica foi desenvolvida usando orto-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) em tampão citrato (50 mM de Na₂HPO₄ e 24 mM e ácido cítrico, pH 5,0). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico concentrado (1M). Os resultados foram quantificados em 490 nm usando um leitor de microplacas automatizado (Meridiam ELX 800 Bio-TEK Instruments, INC., Vermont, EUA). O ensaio foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em triplicata em cada experimento.

5.15 ANÁLISES DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS

5.15.1 Zimograma reverso

A zimografia reversa foi realizada de acordo com Lantz e Ciborowski (1994), com modificações. Amostras contendo 5 µg da serpina recombinante purificada foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com 3 mg/mL de gelatina e então submetidas à eletroforese em condições não redutoras. Logo após a corrida eletroforética, o gel foi incubado com triton 2,5% X-100 (Sigma-Aldrich) por 20 min. Em seguida, o gel foi lavado várias vezes com água filtrada até que as bolhas de espuma fossem removidas, seguido de incubação em tampão contendo tripsina (0,1 mg/mL de tripsina) (Sigma Aldrich) em tampão (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 5 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM), durante 2 h a 37 °C. Uma amostra de 5 µg de inibidor SBTI inibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich) foi usado como controle positivo. O gel foi então corado com uma solução *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (BioRad) por 30 min, e em seguida o gel foi incubado com uma solução de metanol 30% e ácido acético 10% para remover o excesso de corante. As bandas resultantes foram visualizadas após descoloração e o gel foi fotografado. O experimento foi repetido três vezes. A presença de bandas coradas no gel indica a resistência à proteólise pela tripsina e, portanto, inibição desta protease.

5.15.2 Detecção qualitativa da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a tripsina

Amostras de 5 µg da serpina recombinante foram pré-incubadas com 0,1 µg de tripsina por 30 min, a 37 °C antes da incubação com 5 µg de vitronectina. As incubações com a vitronectina foram de 2 e 24 h e os controles também foram feitos nas mesmas condições e na ausência da serpina recombinante. Após as incubações, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE sob condições redutoras.

5.15.3 Detecção quantitativa da atividade inibitória de serpina recombinante sobre a tripsina

A quantificação da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a tripsina foi mensurada usando 2 µg de gelatina de pele de porco conjugada com fluoresceína (Invitrogen). Amostras de 1 µg da serpina recombinante foi previamente incubada com 0,5 µg de tripsina (Sigma Aldrich) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 5 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, por 30 min a 37 °C. As amostras foram incubadas com a gelatina fluorescente por 30 min, a leitura foi feita em espectrofluorímetro (Tecan Infinite M200) com excitação em 480 nm e detecção em 530 nm (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013). A leitura do controle negativo foi subtraída dos tratamentos e dos valores do controle positivo. O experimento foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em pentaplicata em cada experimento.

5.15.4 Detecção da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a morte de *Trypanosoma cruzi* mediados pelo sistema complemento

Soro normal humano (SNH) foi coletado de doadores voluntários não chagásicos e armazenado a -80 °C até o uso (conforme código CAAE para protocolos éticos: 0133.0.208.000-07). A atividade do complemento das amostras de soro foi avaliada pela determinação da diluição do soro necessária para lisar aproximadamente 50% dos parasitas (ensaio de diluição limitante). O controle negativo incluiu parasitas incubados em meio RPMI. Epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c foram lavadas duas vezes em meio RPMI na ausência de SFB e ressuspensas na concentração de 5,0x10⁶/mL. A suspensão do parasita (100 µL, 5,0 x 10⁵/por poço) foi incubada a 37 °C com RPMI e SNH até uma concentração final de 3,12% de SNH em 200 µL. Amostras contendo 5 e 10 µg da serpina recombinante foram testadas.

Uma etapa de pré-incubação da proteína recombinante com o SNH por 30 min foi realizada antes da exposição aos epimastigotas. Após a exposição do parasita ao SNH tratado ou não tratado com a serpina recombinante, as reações foram interrompidas pela adição de 800 µL de RPMI gelado. As amostras foram então mantidas em gelo e analisadas imediatamente. Os parasitas sobreviventes foram quantificados em câmara de Neubauer e objetiva de 40X em microscópio óptico. Motilidade parasitária e morfologia regular foram os parâmetros usados para distinguir

entre parasitas vivos e mortos. O experimento foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em triplicata em cada experimento.

5.15.5 Detecção da atividade inibitória da serpina recombinante sobre a trombina

Amostras contendo 1 e 2 µg da serpina recombinante foram utilizadas para mensurar a inibição da trombina por meio da análise da formação de coágulos sanguíneos. Primeiro, as amostras da serpina recombinante foram pré-incubadas com 1 µg de trombina durante 30 min a 37 °C e incubadas com 500 µL de plasma fresco de coelhos (GREMSKI *et al.*, 2007). A incubação foi realizada durante 5 min, à temperatura ambiente. Em seguida, os coágulos formados foram fotografados e analisados. A área dos coágulos foi medida usando o software ImageJ/Fiji 1,46. O controle positivo foi feito utilizando o plasma com trombina na ausência da serpina recombinante. O experimento foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em triplicata em cada experimento.

5.15.6 Ensaio de atividade inibitória da serpina recombinante sobre a migração de células de melanoma B16-F10 *in vitro* por ensaio de “scratch”

As células B16-F10 (1×10^5 por poço) em meio DMEM suplementado com SFB a 10% foram plaqueadas em uma microplaca de 96 poços. Após as células estarem completamente aderidas, o meio de cultura foi trocado para meio DMEM sem SFB e então incubado por 2 h a 37 °C com 10 µg/mL de mitomicina C. Em seguida, com uma ponteira de 10 µL, foi feito um risco no centro do poço. O meio foi substituído por DMEM com 2% de SFB (LIANG; PARK; GUAN, 2007) seguido de incubação com a serpina recombinante (90 e 110 µg). O controle negativo foi feito na ausência da serpina recombinante. O ensaio foi monitorado por 24 h. Os poços foram fotografados individualmente sob um microscópio Olympus IX71 e câmera de captura Sony Cyber-shot DSC-W35 em 0, 6, 12 e 24 h. A distância entre as duas margens foi medida usando o software ImageJ/Fiji 1,46 em todos os tempos testados. A distância em 0 h foi subtraída das 6, 12 e 24 h, resultando na taxa de migração celular. O experimento foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em pentaplicata em cada experimento.

5.15.7 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade por MTT foram plaqueadas $3,5 \times 10^4$ células B16-F10 em placas de 96 poços em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 16 h, as células foram lavadas com PBS 1X e, então, tratadas com a serpina recombinante (30 e 50 $\mu\text{g}/\text{poço}$) (ZHANG *et al.*, 2000). No controle negativo as células permaneceram em meio DMEM sem SFB. Após o tratamento o meio foi aspirado e foi adicionado às células 100 μL de uma solução 0,5 mg/mL (50 μg) de MTT (Sigma, St. Louis, USA) em PBS. Às células foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C durante 3 h. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 100 μL de DMSO (SIGMA, St. Louis, USA) foram adicionados em cada poço. A reação foi mensurada em espectrofotômetro em 550 nm.

5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas do ensaio de ELISA, do ensaio de migração de células por *scratch* e ensaio de viabilidade celular foram realizadas usando a análise de variância (Two-way ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. A significância foi estabelecida em $p < 0,0001$ usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As análises estatísticas dos ensaios de inibição de morte de *T. cruzi* mediada pelo complemento e da atividade inibitória contra trombina foram feitos usando análise de variância (One-way ANOVA) seguida de teste post hoc de Tukey. A significância foi estabelecida em $p < 0,01$, $p < 0,001$ ou $p < 0,0001$ usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A análise estatística da atividade inibitória contra a tripsina foi realizada usando o teste t não pareado. A significância foi estabelecida em $p < 0,001$ usando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.17 ANÁLISE ESTRUTURAL E DE SIMILARIDADE

A sequência de LSPILT foi analisada pela ferramenta [ProtParam](#), a qual deduz as propriedades físico-químicas a partir da sequência de aminoácidos (aa). A predição de ponte dissulfeto foi feita usando o algoritmo [DiANNA](#) web server versão 1.1. A predição do peptídeo-sinal foi feito pelo algoritmo [SignalP](#) server versão 5.0. A região

conservada entre as serpinas foi analisada pelo padrão de consenso disponível em [PROSITE](#). A predição de sítios de glicosilação foi feita pelo algoritmo [NetNglyc](#) server versão 1.0. As sequências com alta identidade para a sequência de aminoácidos deduzida por cDNA de LSPILT foram pesquisadas no GenBank usando [BLASTp](#), alinhadas usando o algoritmo [Clustal Omega](#) e a padronização foi feita utilizando a ferramenta [BoxShade](#).

RESULTADOS

O primeiro capítulo desse trabalho de tese está apresentado na forma de artigo científico, e descreve os resultados da clonagem, expressão recombinante e descrição das atividades bioquímicas e biológicas de uma serpina do veneno de *L. intermedia* e há resultados que não foram enviados para publicação e estão descritos no capítulo II, que traz mais detalhes sobre a padronização da expressão da serpina recombinante no sistema de células de inseto e resultados adicionais de atividades bioquímicas e biológicas dessa molécula.

Outros três artigos foram publicados durante o período do doutorado e estão em anexo (Anexos 1, 2 e 3).

6 CAPÍTULO I: DESCRIPTION OF A SERPIN TOXIN IN *LOXOCES* (BROWN SPIDER) VENOMS: CLONING, EXPRESSION IN BACULOVIRUS-INFECTED INSECT CELLS AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Description of a serpin toxin in *Loxosceles* (Brown spider) venoms: Cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization

Zelinda Schemczssen-Graeff^a, Hanna Câmara da Justa^a, Jenifer Nowatzki^a, Antonielle Beatriz Baldissera^a, Nayanne Louise Costacurta Polli^a, Elidiana De-Bona^a, Izadora Volpato Rossi^b, Marcel Ivan Ramirez^{b,d}, João Carlos Minozzo^c, Fernando Hitomi Matsubara^a, Andrea Senff-Ribeiro^a, Luiza Helena Gremski^a, Silvio Sanches Veiga^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba 81530-900, PR, Brazil

^b Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, (UFPR), Curitiba 81530-900, PR, Brazil

^c Center for Production and Research of Immunobiological Products (CPPI), State Department of Health, Piraquara 83302-200, PR, Brazil

^d Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2021

Received in revised form 17 May 2021

Accepted 19 May 2021/Available online 21 May 2021

Keywords:

Loxosceles

Venom

Serine protease inhibitor

Eukaryotic expression system

Anticoagulant

Complement inhibition

ABSTRACT

Several classes of toxins are present in the venom of Brown spiders (*Loxosceles* genus), some of them are highly expressed and others are less expressed. In this work, we aimed to clone the sequence of a little expressed novel toxin from *Loxosceles* venom identified as a serine protease inhibitor (serpin), as well as to express and characterize its biochemical and biological properties. It was named LSPILT, derived from *Loxosceles* serine protease inhibitor-like toxin. Multiple alignment analysis revealed high identity between LSPILT and other serpin molecules from spiders and crab. LSPILT was produced in baculovirus-infected insect cells, resulting in a 46-kDa protein fused to a His-tag. Immunological assays showed epitopes in LSPILT that resemble native venom toxins of *Loxosceles* spiders. The inhibitory activity of LSPILT on trypsin was found both by reverse zymography and fluorescent gelatin-degradation assay. Additionally, LSPILT inhibited the complement-dependent lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, reduced thrombin-dependent clotting and suppressed B16-F10 melanoma cells migration. Results described herein prove the existence of conserved serpin-like toxins in *Loxosceles* venoms. The availability of a recombinant serpin enabled the determination of its biological and biochemical properties and indicates potential applications in future studies regarding the pathophysiology of the envenoming or for biotechnological purposes.

© 2021 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The bites of Brown spiders (*Loxosceles* genus) are medically known as loxoscelism or necrotic arachnidism [1,2] and have been reported in several regions of the world such as South America and part of North America. In Brazil, Chile and Peru, for example, accidents involving Brown spiders frequently occur in urban areas and are considered a public health problem [3–8]. Necrotic arachnidism is distinguished by skin lesions near or at the bite site, which involve swelling, redness, itching, hemorrhage and can evolve to severe dermonecrotic lesions with gravitational spreading (the hallmark signal of loxoscelism). Systemic manifestations occur less often and can include intravascular

hemolysis, intravascular coagulation and acute renal disorders, which in some cases can lead to death [4,6,7].

Brown spider venoms are crystalline, colorless and minute in volume [6]. These venoms have had their composition investigated by biochemical, biological, proteomic and molecular biology studies. Transcriptomic analyses pointed out the existence of three major families of highly expressed toxins: Inhibitor Cystine Knot peptides (knottins or ICKs), metalloproteases of the astacin family and phospholipases-D (PLDs) [6–10]. Data also reported lower expressed toxins in the venom glands of *Loxosceles* spiders such as serine proteases, hyaluronidases, translationally controlled tumor protein (TCTP) and allergen (LALLT) [9,11–16].

The mechanism by which venom toxins cause noxious effects in the victims is currently under investigation. In this field, phospholipases-D (also named Dermonecrotic Toxins due to their involvement in skin lesions) alone can reproduce the majority of signals observed such as

* Corresponding author at: Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail address: veigass@ufpr.br (S.S. Veiga).

dermonecrosis, massive and deregulated inflammatory response, thrombocytopenia and renal disturbances [6,8,17]. Additionally, other families of venom toxins that display activities on the extracellular matrix structure, such as metalloproteases and hyaluronidases, can facilitate the dissemination of the venom from the bite site throughout the body, acting as spreading factors. Venom components such as allergen factors and TCTP are also involved in loxoscelism by increasing the production of inflammatory cytokines and triggering local and systemic reactions [13,14,16,18].

The methods currently available to express recombinant molecules have been very helpful to understand how venoms act and, thus, to propose protocols related to the diagnosis and treatment of injured victims. Recombinant toxins are widely used in the studies concerning Brown spider venom, since the amount of venom collected by electrostimulation of the venom glands is small, resulting in low-yield purification of native toxins [6,17,19]. Several recombinant molecules have already been expressed such as phospholipases-D, astacins, knottins, TCTP, allergen and hyaluronidases [8,10,12–16,18,20–23]. Bacterial cells do not have endomembranes that perform co- or post-translational modifications in proteins, such as disulfide bridge formation and protein glycosylation. For this reason, proteins that depend on these modifications are frequently produced in their insoluble forms. Additional procedures required to refold insoluble proteins are often overly laborious, unsuccessful or result in low yield. On the other hand, eukaryotic expression models using insect cells such as Sf9 or Sf21 from *Spodoptera frugiperda* can generate soluble proteins, since they present the membranous organelles responsible for co- and post-translational modifications [24]. For proteins that depend on the correct formation of disulfide bonds for appropriate structural conformation – as is the case of the serine protease inhibitor in this work – the expression system used herein is well suited. We have previously published two studies regarding toxins from *Loxosceles intermedia* venom expressed in baculovirus-infected insect cells Hyaluronidase [16] and an Allergen Factor [15]. Additionally, other researchers have reported successful recombinant protein production using this expression system [24–26]. In this study, we describe the cloning, recombinant expression by using baculovirus-infected insect cells (Sf9) and functional evaluation of a novel serine protease inhibitor (serpin) toxin present in the venom of *Loxosceles intermedia*. This serpin was named LSPILT (*Loxosceles* Serine Protease Inhibitor-Like Toxin). The partial sequence encoding this serpin was previously identified in study regarding the *L. intermedia* venom glands [9] and its sequence shows significant identity with serpins of other spiders such as *Argiope bruennichi* and *Araneus ventricosus*. Serpins are molecules that act inhibiting serine proteases in a wide variety of physiological, pathological and pathophysiological contexts, such as inflammation, coagulation, fibrinolysis and immune response. These molecules often range from 350 to 400 amino acids and present from 40 to 100 kDa [27]. The production of this recombinant toxin in a eukaryotic model unveils the possibility for future structural studies as well as investigations regarding its molecular mechanism of action. In addition, recombinant LSPILT may be used as a tool to further understand the cell biology of envenoming and to perform pharmacological analyses searching for biological applications.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The vector (pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit), the baculovirus recombination kit, BaculoDirect™ C-Term Transfection kit, Cellfectin® II Reagent, Clonase® II Enzyme mix, and Gelatin pig skin conjugated to fluorescein were obtained from Invitrogen (Waltham, USA). The cell culture media for Sf9 cells Sf-900™ II SFM, Grace's Insect Medium unsupplemented and supplemented were obtained from Gibco®. Histrap™ Excel 1 mL column was obtained from GE Healthcare Life Sciences (Marlborough, USA). Trypsin serine protease enzyme was

obtained from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Coomassie Blue G was purchased from BioRad Laboratories (Hercules, USA). The venoms of *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* were kindly provided by CPPI (Production and Research Center of Immunobiological Products, State Department of Health, Piraquara, Paraná, Brazil).

2.2. Cell culture

The Sf9 cell line (Invitrogen, Waltham, USA), derived from the pupal ovarian tissue of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, was used in the expression of the recombinant LSPILT. Sf-900™ II SFM cell culture medium (Gibco®) was used for cell growth and maintenance. Grace's cell culture medium, unsupplemented was used during the transfection step. The antibiotics used were penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco®). The cells were maintained at 28 °C in monolayer or suspension, depending on the procedure.

The murine melanoma cell line B16-F10 was used for in vitro scratch cell migration assay. B16-F10 cells were kept in Dulbecco Minimum Essential Culture (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% Bovine Fetal Serum (SFB, Cultilab) and 40 mg/L gentamicin (Inlab, São Paulo, SP, Brazil). The cells were maintained at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO₂.

2.3. cDNA synthesis and cloning into the pENTR™/D-TOPO® vector

The venom glands from two hundred adult *L. intermedia* spiders were extracted by the Trizol method [28]. The total RNA purified was converted to cDNA by reverse transcription reaction by using the oligo (dT)₁₇ primer (5'-CGGTACCATGGATCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTT-3') and the Improm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, Madison, WI, USA). The cDNAs synthesized were precipitated and then used as a template in a conventional PCR in order to amplify the sequence encoding LSPILT. For this, specific forward (5' ATGTTTCTTCAACGAACTG 3') and reverse (5' TTTCATGTGGATCAACCACTC 3') primers were synthesized based on a sequence encoding a serine protease inhibitor belonging to the serpin family which was identified in the study of the transcriptome of the venom gland of *L. intermedia* [6].

All the protocols for the production of the recombinant LSPILT were performed according to the instructions provided by the manufacturer of the BaculoDirect™ Baculovirus Expression System, with minor modifications. First, in order to clone the toxin sequence into the pENTR™/D-TOPO® vector, adapted primers were designed and synthesized. Four nucleotide residues were added to the 5' end of the forward primer (5'-CACCATGTTTTCTTCAACGAACTG-3') as a requirement for directional cloning into the pENTR™/D-TOPO® vector. The reverse primer was designed to lack the stop codon so that the C-terminal tags (V5 and 6xHis fusion tags) were expressed (5'-TTTCCATTGTGGATCAACCACTC-3'). A conventional PCR was carried out using the adapted primers and the LSPILT amplified cDNA as template. The resultant product of this second amplification was then analyzed by agarose gel electrophoresis, gel-purified, and cloned into the pENTR™/D-TOPO® vector. Next, the construction LSPILT-pENTR™/D-TOPO® was transformed into electrocompetent *E. coli* One Shot® Top 10 cells. Positive clones were subsequently selected, submitted to recombinant plasmid extraction and sequenced by using an automatic sequencer ABI 377 (Applied Biosystems). The M13 Forward (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') and M13 Reverse (5'-CAGGAACAGCTATGAC-3') primers of the pENTR™/D-TOPO® vector were used for sequencing reactions. The sequences were analyzed, and the deduced protein sequences were used to search the GenBank protein data base at NCBI.

2.4. Construction of the recombinant baculovirus and transfection of Sf9 cells

The recombination reaction was performed in a microtube containing 150 ng of the LSPILT-pENTR™/D-TOPO® construction, 4 µL of LR

Clonase® II Enzyme Mix for BaculoDirect™ Kits and 10 µL of BaculoDirect™ Linear DNA. The reaction was incubated for 16 h at 25 °C. After, 10 µL of this reaction was added to another microtube containing 200 µL of Grace's Insect Medium Unsupplemented and 8 µL of Cellfectin®, followed by incubation for 30 min at room temperature. The transfection of Sf9 cells was performed during the logarithmic phase of cell growth, with cell viability greater than 95%. The procedure was performed in a 6-well plate, in which each well held a monolayer of 1×10^6 Sf9 cells and 210 µL of the recombination reaction in Grace's medium for 5 h at 27 °C. Next, the transfection mixture in each well was replaced with a solution containing 2 mL of complete growth medium (Grace's Insect Medium Supplemented and 10% fetal bovine serum) and 100 µM of ganciclovir, which is an antiviral used to select only recombinant viruses. This incubation with ganciclovir was performed for 168 h (7 days) at 27 °C, when signs of viral infection were observed (nuclear and cellular hypertrophy). This was designated as P1 viral stock. P2 viral stock was then prepared using 500 µL of P1 (25%) and, subsequently, P3 viral stock was prepared using 1000 µL (50%) of the prior P2. Finally, higher volumes of P4 viral stocks were prepared using 1–5% of the P3 stock according to Irons et al. [26]. Aiming to determine the amount of P4 to be used in the expression step, a sample of the P4 supernatant was collected in order to quantify the viral load by real-time PCR (RT-qPCR). The quantification of the viral load was determined based on a standard curve using the SYBR™ Green reagent (Applied Biosystems). Conditioned medium from cultured cells that were not transfected was used as negative control. Samples were assayed in pentaplicate.

2.5. Recombinant expression and purification of LSPILT

The recombinant LSPILT was produced on large scale in Erlenmeyer containing 3×10^6 Sf9 infected cells/mL in 500 mL of Sf-900™ II SFM medium in the absence of fetal bovine serum. The cell culture was incubated for 192 h, at 27 °C and under agitation at 110 rpm. After the expression step, the supernatant was collected by centrifugation ($7000 \times g$ for 15 min), followed by filtering using a 0.22 µm membrane filter. LSPILT purification was performed by affinity chromatography with Ni²⁺-NTA resin using the ÄKTA™ pure system (GE Healthcare Life Sciences). For this, filtered supernatant was applied to a HisTrap™ excel column, which was previously equilibrated with buffer A (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.5). Washing steps were performed with buffer B (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.5). Finally, elution was executed in 1 mL fractions by using buffer B. Fractions containing eluted LSPILT were dialyzed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) and analyzed using a 12.5% SDS-PAGE.

2.6. Animals

Adult swiss mice weighing approximately 50 g were provided by the Central Animal House of the Federal University of Paraná and adult New Zealand rabbits weighing 3 kg were purchased from the Canguiri Experimental Farm of Federal University of Paraná and maintained at Production and Research Center of Immunobiology (CPI). All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication n° 85–23, revised 1985), "Brazilian Federal Laws" and Ethical Committee Agreement number 1146 of Federal University of Paraná.

2.7. Production of LSPILT hyperimmune serum

A hyperimmune serum against LSPILT was produced using mice according to Harlow and Lane [29]. Briefly, after collection of the pre-immune serum, the animals were intraperitoneally administered 20 µg of the recombinant LSPILT and aluminum hydroxide was used as adjuvant (Sigma Aldrich). Two additional booster immunizations of 40 and 80 µg of LSPILT were administered at 3-week intervals. Blood

samples were collected 15 days after the third immunization, and the presence of polyclonal antibodies that recognize LSPILT was analyzed by immunoblotting. Hyperimmune sera that recognize whole venom toxins of *L. intermedia*, *L. laeta* or *L. gaucho* venoms were produced in rabbits. After collection of the pre-immune serum, each animal received intramuscular and subcutaneous initial immunizations of 15 µg of the total specific venom emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich). Three other booster immunizations of 30, 40 and 100 µg of total venom emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) were administered at 3-week intervals. Blood samples were collected 21 days after the last immunization, and the presence of polyclonal antibodies against whole venom toxins was analyzed by immunoblotting [15].

2.8. Gel electrophoresis, immunoblotting, and ELISA

LSPILT purified samples had their concentration determined by the Bradford method (Coomassie Blue, BioRad, Hercules, USA) [30]. After quantification, LSPILT purified samples were analyzed using a 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions [31]. Gels were stained with Coomassie Blue dye. For the immunoblotting, samples containing 5 µg of recombinant LSPILT were run on a 12.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters using the Trans-Blot® SD system (15 V for 30 min). The filters were blocked (3% BSA-PBS) for 2 h at room temperature. After the washing step with PBS, the nitrocellulose filters were incubated at room temperature for 2 h with pre-immune serum (1:1500) or antisera against LSPILT (1:1500), *L. intermedia* whole venom (1:1500), *L. gaucho* whole venom (1:1500) or *L. laeta* whole venom (1:1500). Anti-6×-His tag (1:1500) (Abcam, Cambridge, UK) or anti-V5 tag (1:1500) (Abcam) were also used to immunodetect the recombinant LSPILT. Nitrocellulose filters were then incubated with secondary antibodies alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) or alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (1:5000) for 1 h at room temperature. Reactions were developed using the BCIP/NBT reagent as substrate (Promega).

ELISA antibody capture assays were performed using purified LSPILT (10 µg/mL) to sensitize plate bottoms (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) overnight at 4 °C in wet conditions. The plate was washed with tween-PBS (0.1%) and blocked with blocking solution (3% BSA-PBS) for 2 h at room temperature. After washing steps with PBS, the wells in the plate were incubated for 2 h at room temperature with one of the following primary antibodies: antisera against *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho*, or pre-immune serum (dilutions 1:500, 1:1000, 1:2000). Next, the plates were washed with PBS and then incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:5000) (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. The colorimetric reaction was developed using ortho-phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich) in citrate buffer (50 mM of Na₂HPO₄ and 24 mM citric acid, pH 5.0) and stopped with concentrated sulfuric acid (1 M). The results were read at 490 nm using an automated microplate reader (Meridian ELX 800 Bio-TEK Instruments, INC., Vermont, USA). The experiment was repeated three times and all samples were assayed in triplicate in each experiment.

2.9. Reverse SDS-zymography

Reverse zymography was performed according to [32], with modifications. Samples containing 5 µg of the purified recombinant LSPILT were applied to a 10% polyacrylamide gel copolymerized with 3 mg/mL of gelatin and then submitted to electrophoresis under non-reducing conditions. Right after the electrophoretic run, the gel was incubated with 2.5% X-100 triton (Sigma-Aldrich) for 20 min. Next, the gel was washed using filtered water until bubbles were removed, followed by incubation in buffer containing trypsin (0.1 mg/mL trypsin in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 5 mM CaCl₂, NaCl 200 mM, 5 mM MgCl₂) for 2 h at 37 °C. A sample of 5 µg of soybean trypsin inhibitor

(Sigma-Aldrich), a commercial serine protease inhibitor, was used as a positive control. The gel was then stained with a Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) solution for 30 min, followed by incubation with a solution of methanol 30% and acetic acid 10% to remove dye excess. Resulting bands were visualized after destaining and the gel was photographed. The experiment was repeated three times and all samples were assayed in triplicate in each experiment.

2.10. Detection of LSPILT inhibitory activity against trypsin

The quantification of the gelatinolytic activity was measured using 2 µg of Dye-quenched gelatin from pig skin conjugated with fluorescein (Invitrogen). Samples of 1 µg of recombinant LSPILT was previously incubated with 0.5 µg of trypsin in buffer reaction (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) for 30 min at 37 °C. The reactions were then incubated with the fluorescent gelatin for 30 min. After 30 min, reactions were read on a fluorimeter Tecan Infinite M200 with excitation at 480 nm and detection at 530 nm [33]. The reading of the negative control was subtracted from the treatments and from the positive control values. The experiment was repeated three times and all samples were assayed in triplicate in each experiment.

2.11. Complement-mediated death trials of *Trypanosoma cruzi*

Normal human serum (NHS) was collected from voluntary non-chagasic donors and stored at –80 °C until use (according to CAAE code for ethical protocols: 0133.0.208.000-07). Complement activity of serum samples was assessed by determining the serum dilution required

to lyse approximately 50% of the parasites (limiting dilution assay). Negative control included parasites incubated in RPMI medium only. *T. cruzi* epimastigotes of the strain Dm28c were washed twice using RPMI medium in the absence of fetal bovine serum and resuspended to a concentration of 5.0×10^6 /mL. The parasite suspension (100 µL, 5.0×10^5 /per well) was incubated at 37 °C with RPMI and NHS to a final concentration of 3.12% of NHS in 200 µL. Samples containing 5 and 10 µg of the recombinant LSPILT were tested. A pre-incubation step of the recombinant LSPILT with the NHS for 30 min was performed before exposure to epimastigotes. After exposure of the parasite to NHS treated or not treated with LSPILT, the reactions were interrupted by addition of 800 µL of cold RPMI. The samples were then kept on ice and analyzed immediately. Surviving parasites were quantified using a Neubauer chamber and a 40X objective on an optical microscope. Parasitic motility and regular morphology were the parameters used to distinguish between live and dead parasites. The experiment was repeated three times and all samples were assayed in triplicate in each experiment.

2.12. Detection of LSPILT inhibitory activity against thrombin

Samples containing 1 µg and 2 µg of LSPILT were used in order to measure thrombin inhibition by analyzing the blood clot formation. First, recombinant LSPILT samples were pre-incubated with 1 µg of thrombin for 30 min at 37 °C and subsequently incubated with 500 µL of fresh plasma collected from rabbits [34]. The incubation was performed for 5 min at room temperature. After that, the clots formed were photographed and analyzed. The area of the clots was measured using the software ImageJ/Fiji 1.46. Positive control was made using the plasma with thrombin only (absence of the recombinant LSPILT).

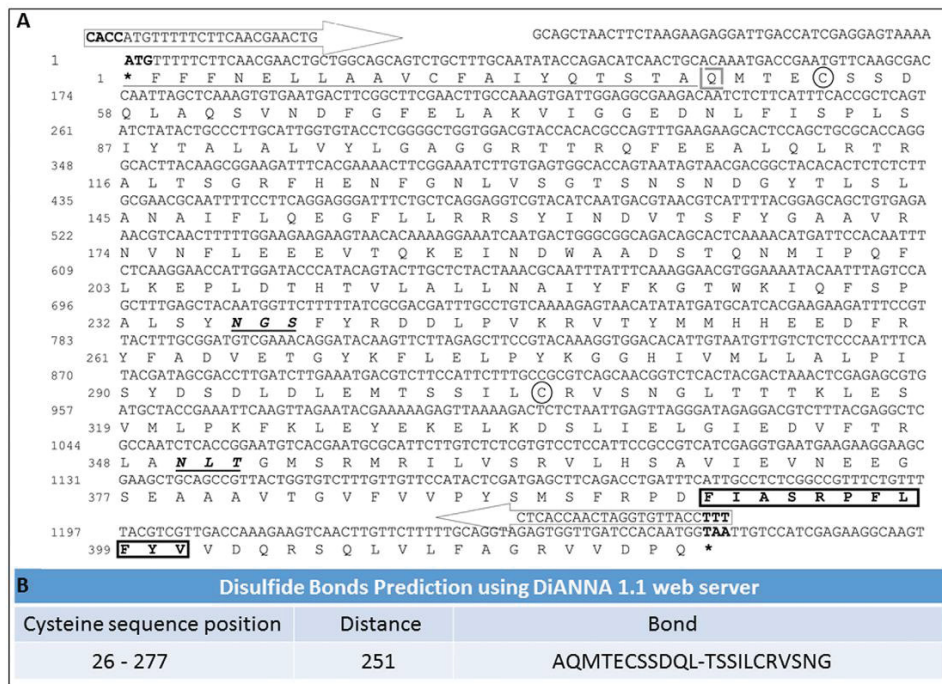


Fig. 1. Nucleotide and cDNA-decoded amino acid sequences of LSPILT. (A) Arrows contain the primers' sequences and indicate the annealing position of these primers in order to clone the cDNA encoding LSPILT into the pENTR™/D-TOPO® vector; the adaptor added in the primer forward (CACC) to allow the correct cloning into the vector is shown in bold. In the protein sequence, the predicted signal peptide containing 21 amino acid residues is underlined and the first amino acid residue in the mature protein (Q) is marked within a square. The two cysteine residues along the protein sequence are depicted inside circles and the two predicted N-glycosylation sites (NGS and NLT) are underlined and shown in bold and italic. The signature that identifies the protein as a serpin (FASRPFLV) is highlighted within a box and the asterisk indicates the stop codon (TAA). (B) Prediction of a disulfide bridge analyzed by using the DiANNA 1.1 web server algorithm. As shown, data indicated 1 disulfide bond.

The experiment was repeated three times and all samples were assayed in triplicate in each experiment.

2.13. Scratch cell migration assay

The B16-F10 cells (1×10^5 per well) in DMEM medium supplemented with 10% SBF were plated on a 96-well microplate. After the cells

completely adhered, the culture medium was changed to DMEM medium without fetal bovine serum and then incubated for 2 h at 37 °C with 10 µg/mL of mitomycin C. After that, using a 10 µL tip, a scratch was performed [35]. The medium was replaced by DMEM with 2% SBF, followed by incubation with LSPILT (90 µg and 110 µg). Negative control was done in the absence of the recombinant LSPILT. Scratches were monitored for 24 h. Wells were individually photographed under a

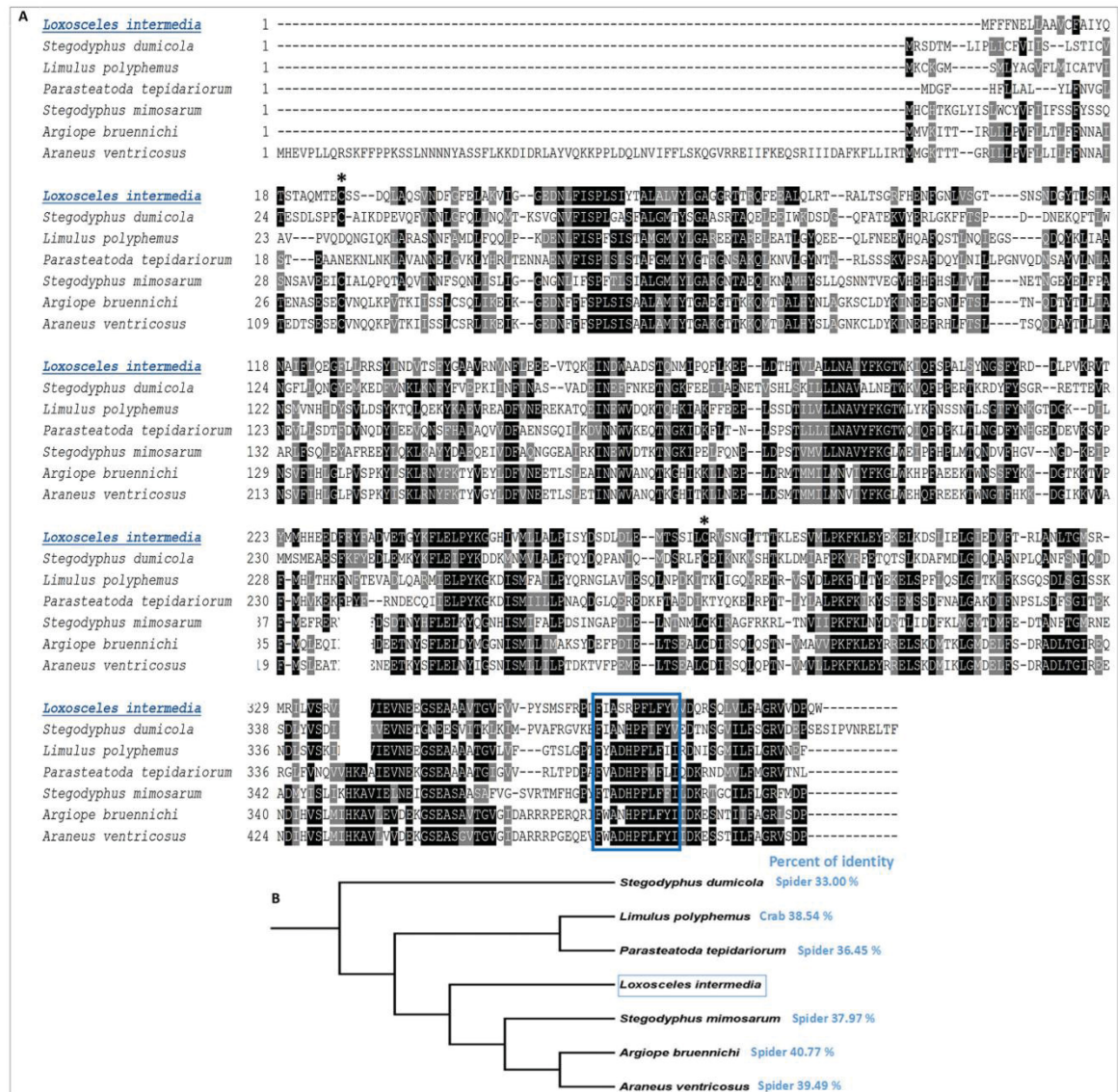


Fig. 2. Multiple sequence alignment analysis of the predicted protein sequence and similarity relationship of the recombinant toxin LSPILT with other serpin-like sequences. (A) Sequences with high identity to LSPILT cDNA-deduced amino acid sequence were searched in GenBank using BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), aligned using the online algorithm Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/CLUSTAL) and presented after standardization using the tool BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Amino acid identities are shaded in black and conservative substitutions are shown in gray. The serpin signature is highlighted inside the blue rectangle. Cysteine residues present in LSPILT are marked with asterisks. The names and accession numbers of the sequences aligned and depicted in the guide tree are: Serpin B10-like protein from *Argiope bruennichi* (KAF8788869.1), Serpin B10 from *Araneus ventricosus* (GBN38250.1), Plasminogen activator inhibitor 2, partial from *Stegodyphus mimosarum* (KFM62677.1), Serpin B3-like isoform X1 from *Limulus polyphemus* (XP_013786814.1), Glia-derived nexin-like from *Stegodyphus dumicola* (XP_035214546.1), Leukocyte elastase inhibitor-like isoform X1 from *Parasteatoda tepidiorium* (XP_015907909.1). (B) Guide tree showing the serpin-like sequences as well as the sequence identity percentages in relation to LSPILT. Both data were generated by Clustal Omega. Regarding the six most similar sequences to LSPILT, five are from spiders and only one is from a crab. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

microscope Olympus IX71 and Sony Cyber-shot DSC-W35 capture camera at 0, 6, 12, and 24 h. The distance between the two margins was measured using the software ImageJ/Fiji 1.46 at all times tested. The distance at 0 h was subtracted from the 6, 12, and 24 h, resulting in the cell migration rate. The experiment was repeated three times and all samples were assayed in pentaplicate in each experiment.

2.14. Statistical analysis

Statistical analyses of ELISA assay and scratch cell migration assay were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test. The significance was established at $p < 0.0001$ using the GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analyses of the complement-mediated death trials of *T. cruzi* and inhibitory activity against thrombin assays were

performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test. The significance was established at $p < 0.01$, $p < 0.001$ or $p < 0.0001$ using the GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis of the inhibitory activity against trypsin assay was carried out using unpaired Student's *t*-test. The significance was established at $p < 0.001$ using the GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Sequence features of the serine protease inhibitor toxin from *L. intermedia* venom gland (LSPILT)

Fig. 1 shows the complete cDNA sequence of LSPILT, which depicts an open reading frame of 1197 bp. cDNA-deduced amino acid sequence

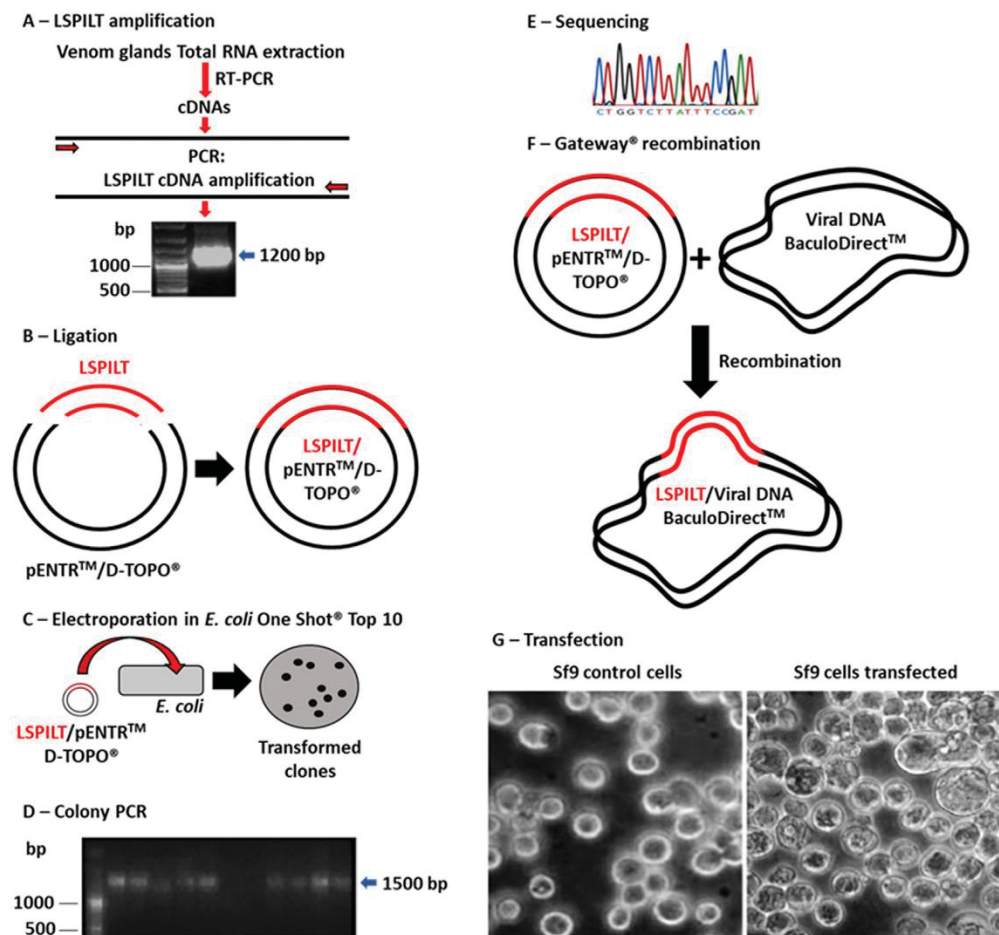


Fig. 3. Molecular cloning of LSPILT, recombinant baculovirus production and transfection into Sf9 cells. (A) Scheme depicting the production of the LSPILT amplified sequence. The total RNA content of venom glands of *L. intermedia* spiders was extracted and converted to cDNA via reverse transcriptase PCR (RT-PCR). The cDNAs were then used as template for the amplification of LSPILT sequence through PCR reaction using specific primers that were designed based on the sequence of a serpin identified in the transcriptome of the venom gland of *L. intermedia*. The PCR resulted in the amplification of a fragment with 1200 bp as expected for LSPILT and visualized by agarose gel (arrow). (B) The band corresponding to LSPILT was gel-extracted and subsequently ligated into the pENTR™/D-TOPO® vector. (C) The resulting construct was transformed into *E. coli* One Shot® Top 10 electrocompetent cells. (D) Positive clones (amplified bands of 1500 bp using M13 Forward and Reverse primers) were screened through colony PCR and are visualized in the agarose gel. (E) Positive clones visualized in the agarose gel were sequenced to confirm the correct LSPILT sequence cloned. (F) One of the positive clones confirmed by sequencing was chosen for the transfection step, which consists of the insertion of the LSPILT into the linear baculovirus DNA through the Gateway system. (G) Comparison of Sf9 control cells and Sf9 cells transfected with the recombinant baculovirus DNA containing the LSPILT sequence; the major distinctions are the cellular and nuclear hypertrophy, in addition to the presence of intracellular granules in the transfected cells when compared to the control cells (400 x magnification).

reveals a protein formed by 399 amino acid residues, including a signal peptide of 21 amino acid residues, which was predicted using the SignalP-5.0 Server algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The deduced protein sequence was analyzed by using the online databases Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) and INTERPRO (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), which classified LSPILT as a member of the Serpin family of serine protease inhibitors. As observed (Fig. 1A), LSPILT contains a serpin sequence signature (HASRPFLFYV) and its calculated molecular mass is 42,488.38 Da, with theoretical pI of 4.96. The first amino acid residue in the mature protein is a Glutamine. Two predicted *N*-glycosylation sites are found (NGS and NLT), as well as 2 cysteine residues responsible for the formation of one disulfide bond (Fig. 1B).

3.2. Multiple sequence alignment analysis

Based on the fact that data described herein were the first to report a complete analysis of DNA sequence of a toxin characterized as serine protease inhibitor (serpin) in a Brown spider venom, we performed a protein BLAST search (BLASTp) on the NCBI database to investigate sequence similarities of LSPILT with other deposited sequences. The results show identity amongst LSPILT and other serpin-like protein sequences, indicating the highest similarity to a serpin-like protein from the spider *Argiope bruennichi* with an overall identity of 40.77% (Fig. 2A and B). Significant similarities were also observed with serpin-like molecules from other 4 spiders and with a serpin from a crab (Fig. 2A and B).

3.3. Molecular cloning, recombinant expression and purification of LSPILT

In order to express LSPILT as a recombinant protein, the open reading frame encoding the complete toxin was amplified through PCR (Fig. 3A), followed by ligation of this sequence into the vector pENTR™/D-TOPO® (Fig. 3B). Then, the construction was transformed into *E. coli* One Shot® Top 10 electrocompetent cells (Fig. 3C), resulting in positive clones

containing an amplified fragment of 1500 bp as confirmed by a colony PCR (Fig. 3D). Positive clones were then sequenced (Fig. 3E), pointing out that the correct sequence was cloned. One of the positive clones was used in the recombination step with the baculovirus DNA (Fig. 3F). The recombinant viral DNA was finally transfected into Sf9 cells for expression (Fig. 3G).

After the transfected cells were produced, subsequent viral stocks were made in order to yield a high-titer viral stock for expression purposes (Fig. 4A). Since the predicted structure of LSPILT shows the existence of 2 potential sites for *N*-glycosylation and 2 cysteine residues that form one disulfide bond, recombinant expression in baculovirus-infected insect cells technology was chosen aiming the production of a correctly folded and functional protein. Recombinant LSPILT was successfully expressed containing a C-terminal region with six histidine residues (6x-his) and v5 tags. LSPILT expression on large scale was carried out in Erlenmeyers containing 500 mL of cell suspension for 192 h, at 27 °C, under agitation (110 rpm) (Fig. 4B). After this period, cell suspension was centrifuged, and the culture supernatant was harvested for the purification process via affinity chromatography. As indicated by the elution profile depicted (Fig. 4C), LSPILT purification was successful and resulted in a final yield of 8 mg/L, as determined by protein quantification. SDS-PAGE analysis under reducing conditions indicated that the purified toxin has approximately 46 kDa (Fig. 4D). The difference between the deduced molecular mass of LSPILT (42 kDa) and the SDS-PAGE mobility for LSPILT is resulted of the 6xHis and V5 tags as well as the additional residues from entry vector and virus DNA, which increase the molecular mass of recombinant LSPILT in approximately 4 kDa.

3.4. Immunological cross-reactivity of recombinant LSPILT and native toxins from different *Loxosceles* venoms

Immunological studies were performed using venoms of the three main *Loxosceles* species that prevail in South America (*L. gaucho*, *L.*

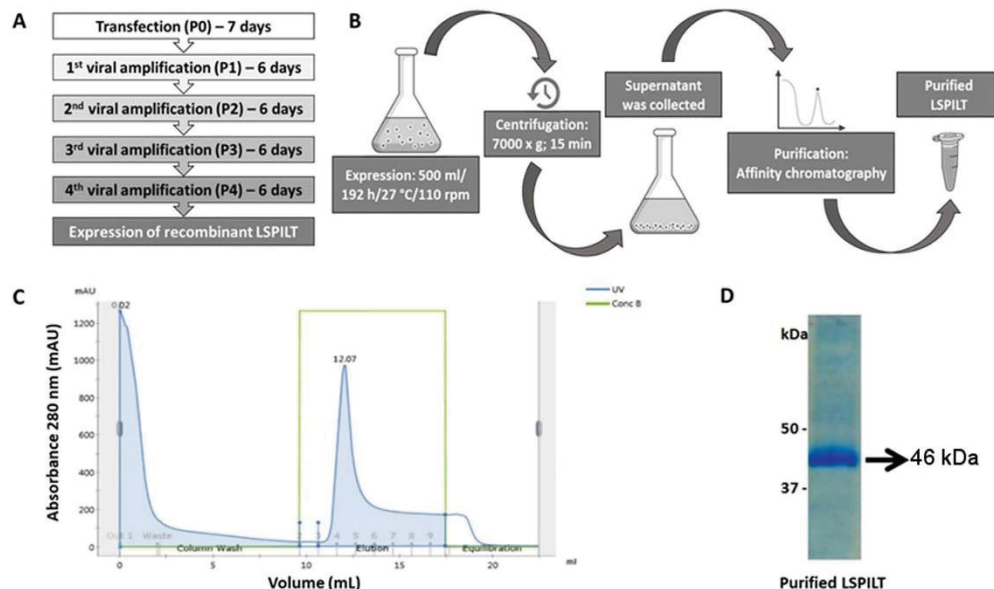


Fig. 4. Recombinant expression and purification of LSPILT. (A) After recombinant baculovirus was transfected into Sf9 cells, successive viral amplifications were carried out in order to obtain a stock with a high viral titer. The high-titer viral stock (P4) was used to transfect Sf9 cells for the expression step. (B) Schematic diagram depicting the expression and purification strategies used in order to produce the recombinant LSPILT. (C) Elution profile of the purified recombinant LSPILT (approximately, 46 kDa) after purification of the culture supernatant through affinity chromatography in Ni²⁺-NTA resin. The purified protein appears as a peak indicating that fractions 4 and 5 of the elution step represented the purified recombinant LSPILT. (D) Electrophoretic profile of the purified LSPILT (5 µg) analyzed on the SDS-PAGE 12.5% under reducing conditions and stained with Coomassie Blue. Molecular mass markers are shown on the left of the figure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

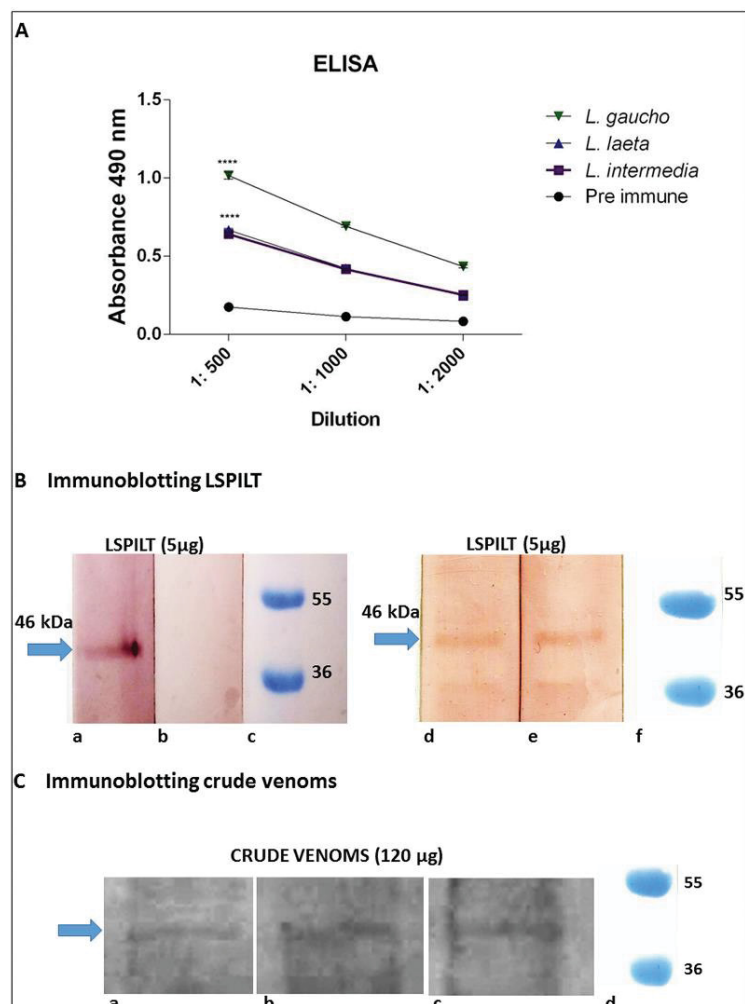


Fig. 5. Cross-reactivity immunoassays between recombinant LSPILT and native toxins from *Loxosceles* venoms. (A) Antibody-capture ELISA was performed by sensitizing plate bottoms with the recombinant LSPILT at a concentration of 10 µg/mL followed by incubation with antisera against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* whole venoms or pre-immune serum (1:500, 1:1000 and 1:2000 dilutions). Each point represents the mean \pm s.d. of three independent experiments ($n = 3$) and **** $p < 0.0001$ indicates significant difference between antisera treatment and re-immune serum. (B) Reactivity between LSPILT and specific antisera was analyzed by western blotting assays. For this, purified recombinant LSPILT (5 µg) was separated by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions and then transferred onto nitrocellulose membranes that were subsequently exposed to antiserum against LSPILT (lane a) and antisera that recognize 6x-His (lane d) or V5 (lane e) tags; pre-immune serum (lane b) was used as negative control. All sera were used in a 1:1500 dilution. Lanes c and f display the molecular mass markers of each experiment. (C) Western blotting analysis showing the cross-reactivity between whole venoms (120 µg) of *L. intermedia* (lane a), *L. laeta* (lane b), and *L. gaucho* (lane c) and the specific serum raised against the recombinant LSPILT (1:1500 dilution). Lane d shows the molecular mass marker.

intermedia and *L. laeta*) in order to analyze epitopes conservation between the recombinant LSPILT and native toxins in the venoms of *Loxosceles* spiders. Antibody-capture ELISA assay, which detects conformational and non-denatured antigen/epitopes, showed that LSPILT was strongly recognized by the antisera raised against the venom toxins of all three species tested in a titer-dependent way when compared to the pre-immune serum, indicating a strong relationship amongst epitopes present in the recombinant and native toxins of the venoms (Fig. 5A). Western blotting assay using the recombinant LSPILT and specific serum that recognizes LSPILT and sera that recognize 6xHis and V5 epitopes resulted in positive reactions, proving that the specific hyper-immune serum raised against the recombinant toxin is efficient in recognizing it and that the protein expressed is LSPILT (Fig. 5B). Cross-

reaction analysis using the venoms of *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* and the serum that specifically recognizes the recombinant LSPILT also resulted in positive reactions, strengthening the idea that serpin toxins constitute a widespread family of molecules conserved in the venom of *Loxosceles* spiders (Fig. 5C).

3.5. Biochemical evaluation of the recombinant LSPILT

In order to test the functionality of recombinant LSPILT, we performed two sequential experiments to verify its biochemical properties. Initially, LSPILT was applied to an SDS-PAGE/reverse zymogram containing copolymerized gelatin and in which a trypsin solution was placed as a source of serine protease. As can be seen in Fig. 6A, purified

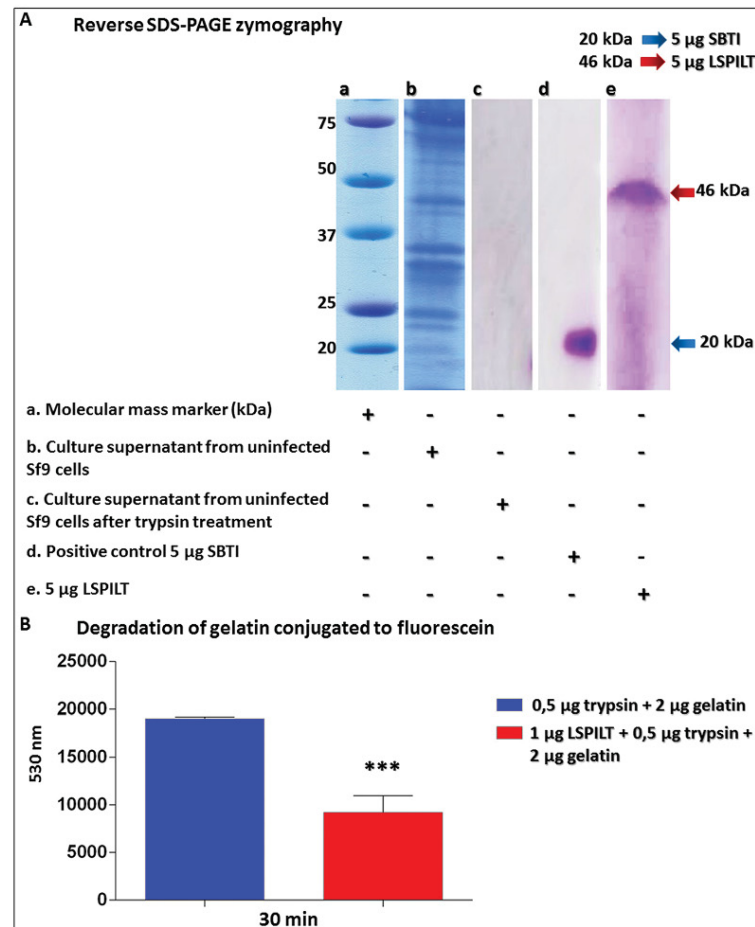


Fig. 6. Effect of recombinant LSPILT on the inhibition of proteolysis induced by trypsin. (A) Reverse zymography. Samples displayed in the lanes c, d and e were analyzed on SDS-PAGE copolymerized with gelatin, which was then incubated with the serine proteinase trypsin, while the sample of lane b was not exposed to the protease. The supernatants of uninfected cells are controls for both the presence of proteins (lane b) and the activity of trypsin (lane c). Lane d displays the inhibitory activity of the positive control soybean trypsin inhibitor (SBTI). Lane e shows the inhibitory activity of purified LSPILT. Arrows point to the bands that correspond to LSPILT (red) and SBTI (blue). Lane a depicts the profile of the molecular mass marker. (B) Quantitative inhibition of trypsin by the recombinant LSPILT. The substrate used was gelatin conjugated to fluorescein and the fluorescence indicating LSPILT inhibitory activity was detected by emission at 530 nm. The values were determined by subtracting the negative control (only fluorescein-conjugated gelatin) of the positive control (blue bar) and treatment (red bar) readings. Samples were incubated for 30 min with the fluorescent gelatin, as depicted in the graph. To test the inhibitory activity of LSPILT, the toxin was previously incubated with of trypsin for additional 30 min. Data represent mean \pm s.d. of three independent experiments ($n = 5$) (** $p < 0.001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

LSPILT was able to inhibit trypsin by remaining as a single stained band in the gel after protease exposure and at electrophoretic expected region of 46 kDa. In addition, an experiment aiming to characterize the inhibitory action of purified recombinant LSPILT on degradation of fluorescent gelatin exposed to trypsin was also carried out. Upon proteolytic digestion, the fluorescence of conjugated gelatin is revealed, and, thus, can be used to measure the enzymatic activity of trypsin. As can be seen in Fig. 6B, recombinant LSPILT efficiently inhibited the cleavage of gelatin, thus confirming the biochemical activity of LSPILT as a serine protease inhibitor molecule.

3.6. Inhibition of complement-dependent lysis of *Trypanosoma cruzi* by LSPILT

The literature has been shown through robust data that the complement system participates in the lysis of *Trypanosoma cruzi* protozoan

when fresh serum is present. This lysis is serine proteases-dependent, with emphasis on convertases that activate molecules of the complement system molecules, resulting in the lysis of these parasites [36–38]. In order to confirm the serine protease inhibitory activity by the recombinant LSPILT, we performed incubation experiments of live *T. cruzi* epimastigotes with fresh serum containing two different amounts of recombinant LSPILT (5 and 10 µg). As can be observed in Fig. 7, recombinant LSPILT was able to inhibit lysis of epimastigotes caused by fresh serum after 15 min of exposure in a concentration-dependent manner. These data confirm LSPILT inhibitory effect on convertases that are active in the complement system response reinforcing its functionality by inhibiting another serine proteases besides trypsin.

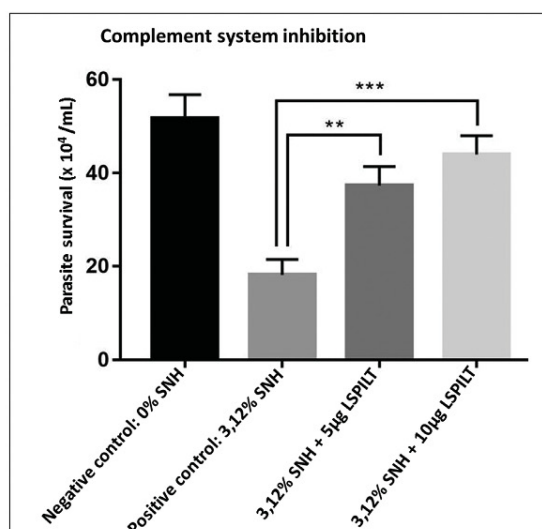


Fig. 7. Effect of recombinant LSPILT on the inhibition of convertases active in the complement system response. The data were acquired by comparing the exposure of epimastigotes (strain Dm28c) to culture medium only (negative control) or normal human serum (NHS) (positive control) or NHS plus recombinant LSPILT (5 µg or 10 µg). Data represent mean \pm s.d. of three independent experiments ($n = 3$) (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

3.7. Inhibitory effect of the recombinant LSPILT on B16-F10 tumor cells migration

The involvement of proteases belonging to the class of metalloproteases in the maintenance and remodeling of the extracellular matrix (ECM) as well as the activity of serine proteases in tumor cells migration are events that have already been described [39,40]. Serpins modulate serine proteases, which in turn modulate various molecules involved in cell migration, especially those related to the control of the proteolysis of ECM components. As a result, serpins are expected to negatively modulate tumor cell migration [41]. In this sense, we performed an experiment to verify the activity of recombinant LSPILT on the migration of B16-F10 cells (a murine melanoma model), which are cells that exhibit great motility capacity under culture conditions. B16-F10 cells were plated in the presence of culture medium without or with increasing concentrations of recombinant LSPILT and evaluated for their cell migration rates through the scratch migration assay. As shown in Fig. 8A and B, B16-F10 cells in the presence of recombinant LSPILT had their migration rates significantly reduced in LSPILT concentration- and time-dependent ways. These data not only prove LSPILT functionality, but also open the possibility to further investigate the inhibitory potential of this new recombinant serpin from *Loxosceles* venoms on tumor metastasis.

3.8. Inhibitory effect of recombinant LSPILT on thrombin-induced clot

Additionally, with the goal to further analyze the functionality of the recombinant LSPILT, we verified its inhibitory effect on thrombin, a serine protease that induces blood clot formation. For this purpose, rabbit plasma was incubated with thrombin in the absence or presence of purified recombinant LSPILT (0.1 and 0.2 µg) for 10 min. As observed in Fig. 9A and B, LSPILT efficiently inhibited clot formation in a concentration-dependent way when compared to the positive control, corroborating its protease inhibitory effect on other serine protease different from trypsin, convertases or B16-F10 serine proteases. These

results strengthen the functionality of recombinant LSPILT and indicate its multiple biological activities.

4. Discussion

Brown spider venoms are complex mixtures enriched in proteins with molecular masses ranging from 5 to 45 kDa [6,7,17]. Literature data has shown a broad characterization of only one group of toxins, which is the family of the phospholipases-D (PLDs). Data regarding PLDs unveil relevant information on the activity of these enzymes as well as great correlation with clinical findings described in injured victims [6,7,17]. However, other lower expressed toxins also exist in the venoms such as serine proteases, allergenic factors, TCTP, hyaluronidases, and neurotoxins, for which there is no much structural, biochemical, biological or clinical information available, except partial DNA sequences from transcriptomic and proteomic identification studies [9,11–13,15]. Another class of toxins present in *Loxosceles* venoms that has been poorly studied and characterized is the superfamily of serine protease inhibitors.

The first partial description of molecules characterized as serine protease inhibitors in Brown spider venoms (*Loxosceles*) came from random cDNA sequencing works of venom-producing gland transcripts. In the analysis of a cDNA library of *L. laeta* venom glands, a partial sequence of a serine protease inhibitor characterized as serpin was identified [11]. Subsequently, the transcriptome analysis of *L. intermedia* venom glands led to the identification of a partial serpin sequence [9]. From this identification, we designed the experimental approach for this work, which represents the production of the first recombinant serine protease inhibitor of *Loxosceles* venoms (LSPILT) classified as a serpin, in addition to its biochemical and biological characterization.

Herein, we report for the first time the molecular cloning of a complete sequence, recombinant expression in baculovirus-infected insect cells, purification and functional evaluation of a *L. intermedia* venom toxin – LSPILT – characterized as a serine protease inhibitor (serpin).

LSPILT cDNA-deduced protein sequence revealed a molecule composed by 399 amino acid residues and with a calculated molecular mass of 42 kDa. These two data are in accordance with molecular features of serpins in general, which consist of proteins ranging from 350 to 400 amino acid residues long and molecular mass varying from 40 to 100 kDa (Fig. 1A) [27]. In silico analyzes confirmed that LSPILT is a member of the Serpin family (MEROPS inhibitor family I4, clan ID). Serpins have a highly conserved central structure which is critical for their mechanism of serine protease inhibition. This mechanism is irreversible, and it involves a rapid conformational change that traps the protease in a covalent complex [42]. Sequence analysis highlighted significant similarity of LSPILT with other serpin-like toxins from other arthropods (Fig. 2). This finding suggests that serpin molecules may be widely distributed and play a key role in the biology of the organisms belonging to this phylum. It is also important to mention that serine protease inhibitors are widely described in the venoms of snakes [43] bees [44], scorpions [45] and other spiders [46], which is a strong indication that these molecules can be important for the biological purpose of venoms.

LSPILT was produced using insect cell as hosts, resulting in a recombinant protein fused to the carboxi-terminal 6xHis and V5 tags, which were useful for the purification step and/or immunoassays carried out to identify the protein that was produced (Fig. 4). Literature data support our choice of insect cells as expression platform over bacterial systems: [47] reviewed methods for recombinant manufacturing of serpins in *E. coli* and showed that expression using bacterial cells often results in insoluble proteins due to misfolding and aggregation (inclusion bodies). As a consequence, refolding steps are necessary, which are frequently time-consuming and unsuccessful. The yield of recombinant LSPILT produced was 8 mg/L, which is subtly greater than the yield of 5–7 mg/L verified for other serine protease inhibitors expressed in *E. coli* and subjected to refolding techniques [47]. Also, the yield for recombinant LSPILT was quite satisfactory when compared to the yield for an allergen

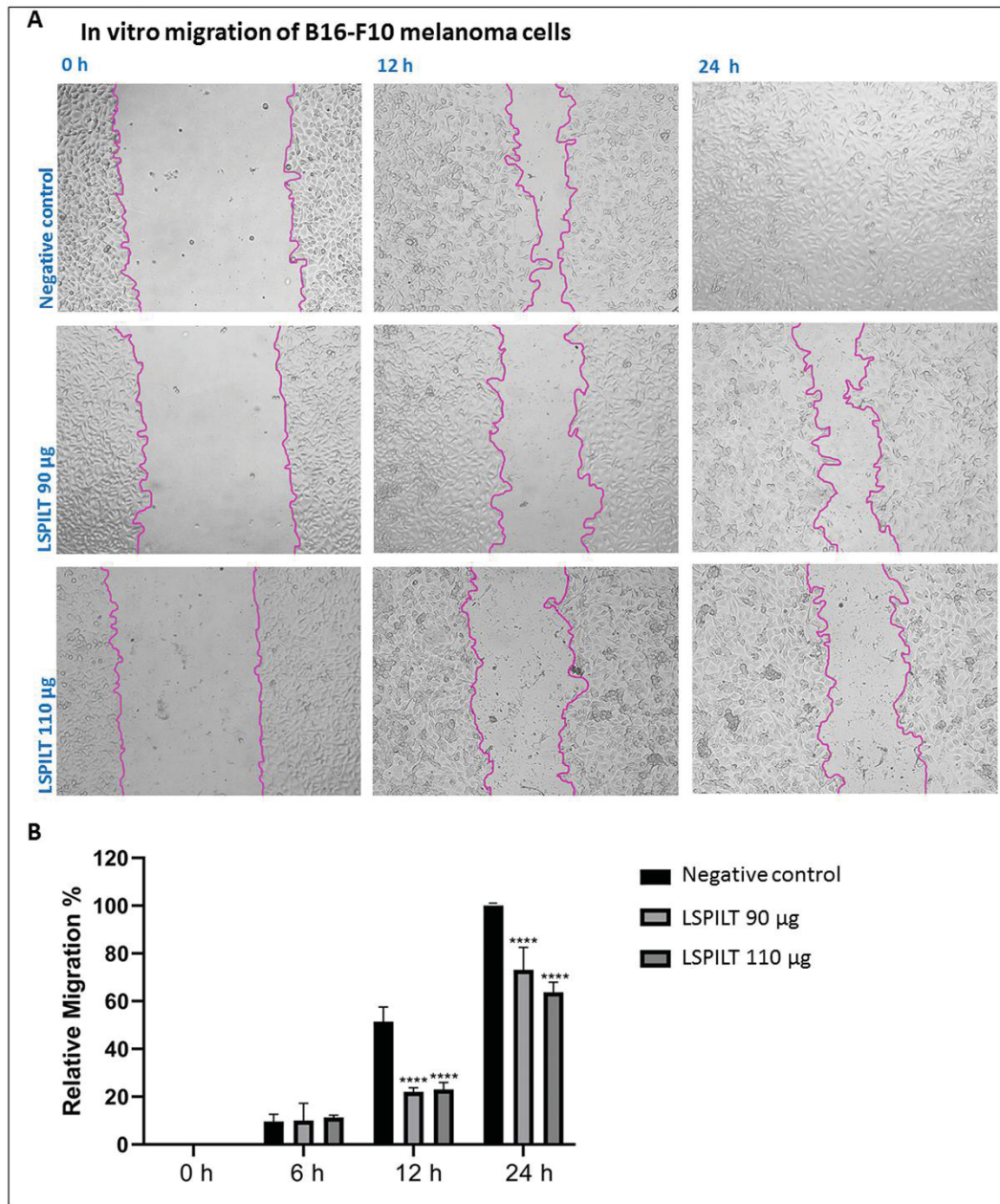


Fig. 8. Scratch cell migration assay. (A) Recombinant LSPILT efficiently inhibited tumor cell migration. Relative migratory capacity of B16-F10 melanoma cells treated or not with recombinant LSPILT was determined by calculating the percentage of the cell-free area using the ImageJ Analysis Software. Data represent mean \pm s.d. of three independent experiments ($n = 5$), **** $p < 0.0001$. (B) Representative images from scratch migration assay. A total of 5×10^4 cells were plated in 96-well plates, treated with mitomycin C and then the cell monolayer was scratched and incubated in the presence of LSPILT (90 and 110 μ g). The negative control was done in the absence of the recombinant LSPILT. Scratches were monitored for 24 h.

toxin from the *L. intermedia* venom that was expressed in the same model and resulted in 0.5 mg/L [15]. The success in producing recombinant LSPILT in its pure and active form is probably related to the possible co- and post-translational modifications performed (N-glycosylation

and disulfide bond formation), followed by the appropriate folding provided by the endomembrane system present in the insect cells used.

Through the use of a rabbit polyclonal antiserum raised using whole venom toxins from *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*, we were able to

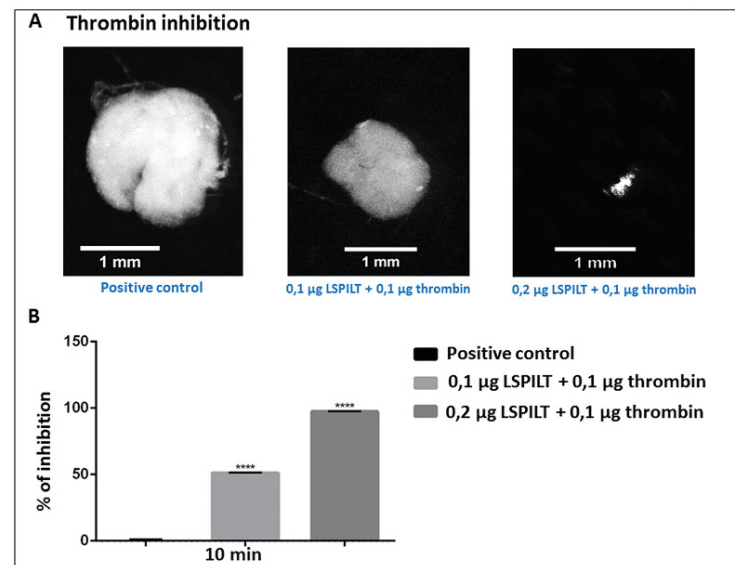


Fig. 9. Thrombin-induced clot formation assay. (A) Clots formed after incubation of human plasma with thrombin or thrombin in the presence of LSPILT. The blood clotting inhibition was assessed using samples containing two amounts of the recombinant LSPILT (0.1 µg and 0.2 µg) pre-treated with 0.1 µg of thrombin for 30 min at 37 °C and then incubated with 500 µL of fresh human plasma for 10 min at room temperature. (B) Relative inhibition of thrombin activity was determined by calculating the percentage of the clot area measured by ImageJ Analysis Software and assuming the area of the positive control as 0% of inhibition and 0 mm² of area as 100% of inhibition. All samples were assayed in triplicate and data represent mean \pm s.d. of three independent experiments (****p (0,0001).

detect a reaction with recombinant LSPILT (Fig. 5A). This result proves that LSPILT is a component of *L. intermedia* venom and suggests the existence of LSPILT orthologs in the venoms of *L. laeta* and *L. gaucho*. Also, by using a mouse polyclonal antiserum raised against recombinant LSPILT, we observed cross-reaction with toxins of approximately 42 kDa in the crude venoms of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*, which again indicates the presence of LSPILT orthologs with conserved epitopes in different Brown spider venoms (Fig. 5C). Studies regarding metalloproteases, ICK peptides and allergen toxins from *L. intermedia* have shown equivalent data using the same immunoassays and cDNA sequences screening, strengthening the idea that these group of toxins are widespread within the genus [10,15,48].

In order to prove the activity of the recombinant protein as a serine protease inhibitor, we evaluated the functionality of recombinant LSPILT performing biochemical and biological analyses. First, through a reverse zymography containing copolymerized gelatin and trypsin as a protease agent, we were able to detect an efficient inhibition of gelatin-induced hydrolysis caused by trypsin (Fig. 6A). This result further corroborates the inhibition of gelatin degradation by trypsin using a fluorescent assay (Fig. 6B). Together these two independent analyses proved the biochemical functionality of recombinant LSPILT produced. Further, we analyzed biological activities of recombinant LSPILT as a serine protease inhibitor through three different assays. First, we studied the effect of recombinant LSPILT on the lytic activity caused by human serum on live *T. cruzi* epimastigotes forms, an event well described in the literature as dependent of serine protease convertases of the complement system (Fig. 7) [37,49,50]. As reported, LSPILT inhibited serum-dependent lysis of *T. cruzi* epimastigotes in a concentration-dependent manner, indicating its biological activity as a serpin that regulates the complement system cascade. This result corroborates other studies regarding serpins that interfered in the three pathways of the human complement system at different stages of its activation [51]. The functionality of recombinant LSPILT was also demonstrated by its inhibitory action on tumor cells migration (Fig. 8), an event in which serine proteases have the ability to interfere with, as

shown by literature data [41]. As shown, treatments of cultured B16-F10 cells with recombinant LSPILT efficiently caused the inhibition of cell migration in a concentration- and time-dependent fashion, suggesting that LSPILT is able to experimentally inhibit molecules involved in the ECM modulation, which is required for the active movement of tumor cells. Other serpins, such as human maspin and SERPIN-F1, also showed antitumor activity [52,53]. Finally, we evaluated LSPILT inhibitory effect on the serine protease thrombin in the context of blood clot formation (Fig. 9). As observed, purified LSPILT efficiently inhibited thrombin-induced clot formation, also in a concentration-dependent way, further proving LSPILT functionality.

The data reported herein bring novel and applicable results that are valuable to understand the biology of *Loxosceles* venoms. However, many other relevant questions are yet to be answered. What is the biological function triggered by native serpins present in *Loxosceles* venoms? Do these toxins play a key role in the noxious activities on victims during accidents? Is their biological conservation explained by their function on the protection of venom toxins from self-protease hydrolysis in the venom gland during the biosynthesis process? Are these serpins involved in the protection of other toxins against protease hydrolysis when venom is inoculated in the tissues of victims or in the tissues of preys that were captured for feeding purposes? Do serpins increase the half-life of venoms toxins when they are injected in humans or preys? These are questions that have not yet been fully answered. However, several serine protease inhibitors from snake venoms were already studied and, according to their activities, they may be involved on the influence of proteases on coagulation, fibrinolysis and inflammation [54–58]. Vascular permeability experiments using mice skin-injected with recombinant LSPILT showed no significant macro or microscopic alterations such as edema, erythema, bleeding or tissue destruction [15], suggesting that *Loxosceles* venom serpins apparently do not cause deleterious activities skin of accidental patients.

The idea regarding the presence of toxins characterized as serine protease inhibitors in Brown spider venoms makes sense due to the complex environment described for these venoms. Amongst the various

molecules found intra-gland and secreted in venoms are serine proteases [9,11,59]. Therefore, the presence of components with inhibitory potential on serine proteases could play a protective regulatory role in the venom, preventing proteolysis and self-degradation of venom protein components. Additionally, molecules with serine protease inhibitory activity could protect the venom components from serine proteases found in bite site or in the blood of victims or in the prey's fluids.

Although the toxins in the venoms of *Loxosceles* spiders characterized as serpins did not have their actions established in the context of envenoming, an interesting possibility is the potential biotechnological uses of LSPILT evoked by this work. In a world where there is a large amount of serine proteases involved in biological events, the identification and expression of a new recombinant serine protease inhibitor give rise to great technological possibilities for research or even for applied uses in the pharmaceutical industry. Studies involving serine proteases such as thrombin and plasmin and their respective inhibitors are clear examples of hematology research protocols that can be explored in order to produce a therapeutic approach to be used in the area of coagulation. Studies involving cellular biology of cell division cycle and pathological mechanisms underlying the tumor migration, which involve serine proteases in the regulation, also deserve mention. Therefore, the recombinant production of a new and functional serine protease inhibitor can lead to potential therapeutic or biotechnological applications.

By using molecular biology methodologies, which support the production of recombinant folded toxins in eukaryote models, it will be possible to study the mechanisms by which these molecules can modulate the signals of *Loxoscelism* or how they participate in the biology of Brown spiders. Recombinant LSPILT could be used in a near future for tridimensional structure studies using crystallization and X-ray diffraction techniques. Also, protein engineering studies and site-mutated orthologs will contribute to improving the knowledge in the area.

5. Conclusion

In the data reported herein, for the first time in the literature, we recombinantly produced a Brown spider venom component (LSPILT) biochemically characterized as a serine protease inhibitor belonging to the serpin family. Immunoassays showed that serpins are likely to be present in all *Loxosceles* venoms, suggesting their biological importance. Through a varied range of biological and biochemical experiments, recombinant LSPILT was able to inhibit several serine proteases, which confirms its potential to be biotechnologically explored.

CRedit authorship contribution statement

Zelinda Schemczssen-Graeff, Marcel Ivan Ramirez, Luiza Helena Gremski, Silvio Sanches Veiga: Conceptualization; Zelinda Schemczssen-Graeff: Data curation; Andrea Senff-Ribeiro, Luiza Helena Gremski, Silvio Sanches Veiga: Funding acquisition; Zelinda Schemczssen-Graeff, Hanna Câmara da Justa, Jenifer Nowatzki, Antonielle Beatriz Baldissera, Nayanne Louise Costacurta Polli, Elidiana De-Bona, Izadora Volpato Rossi: Methodology; Marcel Ivan Ramirez, João Carlos Minozzo: Resources; Luiza Helena Gremski, Silvio Sanches Veiga: Supervision; Luiza Helena Gremski, Silvio Sanches Veiga: Validation; Zelinda Schemczssen-Graeff, Fernando Hitomi Matsubara, Silvio Sanches Veiga Writing - original draft; Marcel Ivan Ramirez, Fernando Hitomi Matsubara, Andrea Senff-Ribeiro, Luiza Helena Gremski, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by grants from UFPR [grant numbers 04/2019, 02/2020], CNPq [grant numbers 408633/2018-2, 303868/2016-

3], CAPES, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-PR/SETI-PR/SESA-PR/MS-Decit/PPSUS, Brazil [grant number 057/2017].

References

- [1] J.M. Futrell, *Loxoscelism*, *Am J Med Sci* 304 (1992) 261–267, <https://doi.org/10.1097/00000441-199210000-00008>.
- [2] D.L. Swanson, R.S. Vetter, *Loxoscelism*, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 213–221, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.006>.
- [3] C.J. Hogan, K.C. Barbaro, K. Winkel, *Loxoscelism: old obstacles, new directions*, *Ann. Emerg. Med.* 44 (2004) 608–624, <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2004.08.028>.
- [4] G.K. Isbister, H.W. Fan, *Spider bite*, *Lancet* 378 (2011) 2039–2047, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62230-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62230-1).
- [5] R.S. Vetter, Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses, *Toxicon* 58 (2011) 623–625, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.009>.
- [6] L.H. Gremski, D. Trevisan-Silva, V.P. Ferrer, F.H. Matsubara, G.O. Meissner, A.C.M. Wille, L. Vuitika, C. Dias-Lopes, A. Ullah, F.R. De Moraes, C. Chávez-Olortegui, K.C. Barbaro, M.T. Murakami, R.K. Ami, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins, *Toxicon* 83 (2014) 91–120, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
- [7] D. Chaves-Moreira, A. Senff-Ribeiro, A.C.M. Wille, L.H. Gremski, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Highlights in the knowledge of brown spider toxins, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23 (2017) 6, <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0097-8>.
- [8] L.H. Gremski, H.C. da Justa, T.P. da Silva, N.L.C. Polli, B.C. Antunes, J.C. Minozzo, A.C.M. Wille, A. Senff-Ribeiro, R.K. Ami, S.S. Veiga, Forty years of the description of brown spider venom phospholipases-D, *Toxins (Basel)* 12 (2020) 164, <https://doi.org/10.3390/toxins12030164>.
- [9] L.H. Gremski, R.B. Da Silveira, O.M. Chaim, C.M.A. Probst, V.P. Ferrer, J. Nowatzki, H.C. Weinschutz, H.M.I. Madeira, W. Gremski, H.B. Nader, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis, *Mol. Biosyst.* 6 (2010) 2403–2416, <https://doi.org/10.1039/c004118a>.
- [10] F.H. Matsubara, L.H. Gremski, G.O. Meissner, E.S. Constantino Lopes, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches, *Toxicon* 71 (2013) 147–158, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.014>.
- [11] M. de F. Fernandes-Pedrosa, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, L.S. Kobashi, D.D. Almeida, P.L. Ho, D.V. Tambourg, Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags, *BMC Genomics* 9 (2008) 1–12, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>.
- [12] Y.B. Sade, M. Bóia-Ferreira, L.H. Gremski, R.B. da Silveira, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 170–177, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>.
- [13] V.P. Ferrer, T.L. de Mari, L.H. Gremski, D. Trevisan Silva, R.B. da Silveira, W. Gremski, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, H.B. Nader, S.S. Veiga, A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's hyaluronidase): from cloning to functional characterization, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013), e2206, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>.
- [14] M. Bóia-Ferreira, K.G. Moreno, A.B.C. Basilio, L.P. da Silva, I. Vuitika, B. Soley, A.C.M. Wille, L. Donatti, K.C. Barbaro, O.M. Chaim, L.H. Gremski, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, TCTP from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom contributes to the allergic and inflammatory response of cutaneous *Loxoscelism*, *Cells* 8 (2019) 1489, <https://doi.org/10.3390/cells8121489>.
- [15] H.C. da Justa, F.H. Matsubara, E. de-Bona, Z. Schemczssen-Graeff, N.L.C. Polli, T.L. de Mari, M. Bóia-Ferreira, J.C. Minozzo, A.C.M. Wille, A. Senff-Ribeiro, L.H. Gremski, S.S. Veiga, LALLT (*Loxosceles* allergen-like toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 3984–3999, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.212>.
- [16] E. De-Bona, D. Chaves-Moreira, T.B.D. Batista, H.C. da Justa, G.R. Rossi, B.C. Antunes, F.H. Matsubara, J.C. Minozzo, A.C.M. Wille, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, L.H. Gremski, Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells, *Enzym. Microb. Technol.* (2021), 109759, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109759>.
- [17] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M. Helena Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.
- [18] R.B. da Silveira, O.M. Chaim, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases, *Toxicon* 49 (2007) 758–768, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.024>.
- [19] H.H. Sams, C.A. Dunnick, M.L. Smith, L.E. King, Necrotic arachnidism, *J. Am. Acad. Dermatol.* 44 (2001) 561–576, <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.112385>.
- [20] E. Kalapothakis, S.C. Araujo, C.S. de Castro, T.M. Mendes, M.V. Gomez, O.C. Mangili, I.C. Gubert, C. Chávez-Olortegui, Molecular cloning, expression and immunological properties of LId1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 40 (2002) 1691–1699, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00201-5).

- [21] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. von Dietrich, H.B. Nader, S. Sanches Veiga, Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>.
- [22] A. Olvera, B. Ramos-Cerrillo, J. Estévez, H. Clement, A. de Roodt, J. Paniagua-Solis, H. Vázquez, A. Zavaleta, M. Salas Arruz, R.P. Stock, A. Alagón, North and south American Loxosceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens, *Toxicon* 48 (2006) 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.010>.
- [23] R. Bertoni da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from Loxosceles intermedia (Brown spider) venom gland, *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>.
- [24] M.M. Van Oers, G.P. Pijlman, J.M. Vlak, Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology, *J. Gen. Virol.* 96 (2015) 6–23, <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>.
- [25] A. Jayakumar, Production of serpins using baculovirus expression systems, *Methods* 32 (2004) 177–184, [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00209-3).
- [26] S.L. Irons, A.C. Chambers, O. Lissina, L.A. King, R.D. Possee, Protein production using the Baculovirus expression system, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 91 (2018) <https://doi.org/10.1002/cpps.45>.
- [27] W. Sanrattana, C. Maas, S. de Maat, SERPINS—from trap to treatment, *Front. Med.* 6 (2019) <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00025>.
- [28] P. Chomczynski, A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *Biotechniques* 532–4 (15) (1993) 536–537.
- [29] D.L. Harlow, E. D. A laboratory manual, Cold Spring Harb. Lab (1988) 579.
- [30] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [31] U.K. LAEMMLI, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [32] M.S. Lantz, P. Ciborowski, [45] Zymographic Techniques for Detection and Characterization of Microbial Proteases, 1994 563–594, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35171-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35171-6).
- [33] D. Trevisan-Silva, A.V. Bednaski, L.H. Gremski, O.M. Chaim, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches, *Toxicon* 76 (2013) 11–22, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>.
- [34] L.H. Gremski, O.M. Chaim, K.S. Paludo, Y.B. Sade, M.F. Otuki, M. Richardson, W. Gremski, E.F. Sanchez, S.S. Veiga, Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucorolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom, *Toxicon* 50 (2007) 120–134, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.002>.
- [35] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- [36] I. dos S. Cestari, A. Krarup, R.B. Sim, J.M. Inal, M.I. Ramirez, Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of Trypanosoma cruzi, *Mol. Immunol.* 47 (2009) 426–437, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.030>.
- [37] K.C.F. Lidani, L. Bavia, A.R. Ambrosio, I.J. de Messias-Reason, The complement system: a prey of Trypanosoma cruzi, *Front. Microbiol.* 8 (2017) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.
- [38] R.D. Arroyo-Olarte, I. Martínez, M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic, B. Espinoza, Complement system contributes to modulate the infectivity of susceptible TcI strains of Trypanosoma cruzi, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113 (2018) <https://doi.org/10.1590/0074-02760170332>.
- [39] M. Del Rosso, G. Fibbi, M. Pucci, S. D'Alessio, A. Del Rosso, L. Magnelli, V. Chiarugi, Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases, *Clin. Exp. Metastasis* 19 (2002) 193–207, <https://doi.org/10.1023/a:1015531321445>.
- [40] G. Huasong, D. Zongmei, H. Jianfeng, Q. Xiaojun, G. Jun, G. Sun, W. Donglin, Z. Jianhong, Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 suppresses cell migration and invasion in glioma cells, *Brain Res.* 1600 (2015) 59–69, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.017>.
- [41] S. Rakash, Role of proteases in cancer: a review, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 7 (2012) 90–101, <https://doi.org/10.5897/BMBR11.027>.
- [42] J.A. Huntington, Serpin structure, function and dysfunction, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 26–34, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x>.
- [43] A.K. Mukherjee, S.P. Mackessy, Pharmacological properties and pathophysiological significance of a Kunitz-type protease inhibitor (Rusvikunin-II) and its protein complex (Rusvikunin complex) purified from Daboia russelii russelii venom, *Toxicon* 89 (2014) 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.016>.
- [44] Y.M. Choo, K.S. Lee, H.J. Yoon, Y. Qiu, H. Wan, M.R. Sohn, H.D. Sohn, B.R. Jin, Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor, *PLoS One* 7 (2012), e32269, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032269>.
- [45] M.A. Hakim, S. Yang, Discoveries of serine protease inhibitors from scorpions, *J. Proteomics Bioinform.* 04 (2016) <https://doi.org/10.4172/jpb.1000395>.
- [46] H. Wan, K.S. Lee, B.Y. Kim, M. Yuan, S. Zhan, H. You, J. Li, B.R. Jin, A spider (Araneus ventricosus) chymotrypsin inhibitor that acts as an elastase inhibitor and a microbial serine protease inhibitor, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 165 (2013) 36–41, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.03.004>.
- [47] P.L. Bird, S.C. Pak, D.M. Worrall, S.P. Bottomley, Production of recombinant serpins in Escherichia coli, *Methods* 32 (2004) 169–176, [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00208-1](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00208-1).
- [48] D.R. Buch, F.N. Souza, G.O. Meissner, A.M. Morgon, L.H. Gremski, V.P. Ferrer, D. Trevisan-Silva, F.H. Matsubara, M. Boia-Ferreira, Y.B. Sade, D. Chaves-Moreira, W. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity, *Toxicon* 108 (2015) 154–166, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.041>.
- [49] I. Cestari, M.I. Ramirez, Inefficient complement system clearance of Trypanosoma cruzi Metacyclic Trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells, *PLoS One* 5 (2010), e9721, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009721>.
- [50] I. Cestari, I. Evans-Osses, L.J. Schlapbach, I. de Messias-Reason, M.I. Ramirez, Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites, *Mol. Immunol.* 53 (2013) 328–334, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.015>.
- [51] A. Mika, S.L. Reynolds, F.C. Mohlin, C. Willis, P.M. Swe, D.A. Pickering, V. Halilovic, L.C. Wijeyewickrema, R.N. Pike, A.M. Blom, D.J. Kemp, K. Fischer, Novel scabites mite serpins inhibit the three pathways of the human complement system, *PLoS One* 7 (2012) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040489>.
- [52] E.I. Chen, J.R. Yates, Maspin and tumor metastasis, *IJMB Life* 58 (2006) 25–29, <https://doi.org/10.1080/15216540500531721>.
- [53] T. Bhakuni, M.F. Ali, I. Ahmad, S. Bano, S. Ansari, M.A. Jairopuri, Role of heparin and non heparin binding serpins in coagulation and angiogenesis: a complex interplay, *Arch. Biochem. Biophys.* 604 (2016) 128–142, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.018>.
- [54] J. Shafiqat, Z.H. Zaidi, H. Jörnvall, Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (Naja naja naja), *FEBS Lett.* 275 (1990) 6–8, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81426-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81426-O).
- [55] L. Chang, C. Chung, H.-B. Huang, S. Lin, Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of Ophiophagus hannah (King cobra), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283 (2001) 862–867, <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4878>.
- [56] E.-K.I. Millers, M. Trabi, P.P. Masci, M.F. Lavin, J. de Jersey, L.W. Guddat, Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (Pseudonaja textilis), *FEBS J.* 276 (2009) 3163–3175, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07034.x>.
- [57] W.M. Chou, W.H. Liu, K.C. Chen, L. Sen Chang, Structure-function studies on inhibitory activity of Bungarus multicinctus protease inhibitor-like protein on matrix metalloprotease-2, and invasion and migration of human neuroblastoma SK-N-SH cells, *Toxicon* 55 (2010) 353–360, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.012>.
- [58] K. Morais-Zani, K. Grego, R. Torquato, C. Silva, A. Tanaka, A. Tanaka-Azevedo, Cloning, characterization and anti-inflammatory properties of Bothrops jararaca Snake Antithrombin, *Protein Pept. Lett.* 22 (2015) 410–418, <https://doi.org/10.2174/0929866522666150216150704>.
- [59] S.S. Veiga, R.B. Da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, A.M. Pereira, O.C. Mangili, W. Gremski, Identification of high molecular weight serine-proteases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom, *Toxicon* 38 (2000) 825–839, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00197-X).

7 CAPÍTULO II – PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LSPILT EM SISTEMA EUCARIOTO USANDO CÉLULAS DE INSETOS

7.1 RESULTADOS

Para uma produção de LSPILT em quantidade ideal para avaliar atividades biológicas e bioquímicas foram necessários vários ensaios de padronização. Variáveis como: volume de expressão, número de células por mL, tempo de expressão e titulação viral, foram testadas. A titulação viral foi feita por RT-qPCR do sobrenadante da terceira e quarta amplificação viral P3 e P4. O título viral alcançado para o P4 foi de 1×10^7 pfu/mL (*plaque-forming unit/mL*) para o P3 a titulação viral foi bem próxima ao título do P4. O cálculo da MOI (*Multiplicity of Infection*) foi determinado em porcentagem do volume do sobrenadante P4. Para obter uma MOI de 5 foi necessário adicionar 5% do volume do sobrenadante P4 na cultura de células de expressão.

Como os ensaios de padronização obtidos mostraram que a melhor produtividade da LSPILT foi com 5% do volume do P4 os demais ensaios foram feitos utilizando essa porcentagem.

Os ensaios iniciais de padronização da expressão foram feitos em placa de seis poços e em garrafas, iniciando com garrafas de 25 cm² depois 75 cm², com o número de células proporcionais ao tamanho de cada superfície, entretanto, a LSPILT não foi detectada nos ensaios de *western blotting* e zimograma reverso nos volumes de até 12 mL de expressão. O primeiro ensaio de padronização que foi possível detectar a LSPILT foi feito em garrafa de 150 cm² em volume de 25 mL com $9,6 \times 10^5$ cél/mL e com 144 h de expressão, 5% de titulação viral P4. Esse volume foi concentrado 12 X em centrífuga a vácuo refrigerada (TABELA 1). A expressão da LSPILT nas condições desse primeiro teste positivo foi baixa (FIGURA 8) o que mostrou ser necessário aumentar os volumes das culturas celulares de expressão.

O segundo ensaio de padronização que foi possível detectar a LSPILT, foi feito em suspensão, com $2,5 \times 10^6$ cél/mL, em volume inicial de 40 mL, o volume da titulação viral P4 foi fracionado e adicionado 2,5% na hora zero da expressão e após 24 h do início da expressão adicionado mais 2,5% do volume do P4. Do volume de 40 mL de expressão, 10 mL foi coletado com 72 h de expressão, 10 mL foi coletado com 96 h, e o ensaio foi finalizado com 120 h, sendo o último horário com volume final de 20 mL.

Todos esses volumes foram concentrados 12 X e avaliados por *western blotting* (TABELA 1 e FIGURA 8). Nesse ensaio de expressão a LSPILT foi detectável, entretanto, a expressão ainda teve baixa produção da proteína e não teve diferença expressiva de expressão entre os três tempos testados (FIGURA 8). Foi observado que as células estavam viáveis em 20% com 120 h de expressão.

A tabela 1 resume a padronização da expressão da LSPILT e mostra que o melhor tempo de expressão foi de 8 dias (192 h), em suspensão, com volume de 500 mL com $3,5 \times 10^6$ cél/mL. O volume da titulação viral P4 foi adicionado de forma fracionada, sendo adicionado na hora zero de expressão 2% do P4, com 96 h adicionado mais 2% e com 144 h de expressão mais 1% do P4, totalizando 5%. A viabilidade celular foi acompanhada durante o período de expressão, sendo observado que em 144 h de expressão as células permaneciam com alta viabilidade, acima de 90% das células estavam viáveis, a morfologia das células mostrava alterações como hipertrofia das células e dos núcleos, o que é descrito para uma infecção viral efetiva. No último dia de expressão com 192 h as células estavam com 40% de viabilidade o que determinou finalizar a expressão e seguir para purificação e ensaios de presença e atividade da LSPILT. O rendimento dessa expressão foi de 4 mg/500 mL, ou seja, 8 mg/L. A tabela 1 mostra em destaque (rosa) as condições ideais de porcentagem do sobrenadante de alta titulação viral (P4), volumes e tempo de expressão em que a LSPILT foi detectada.

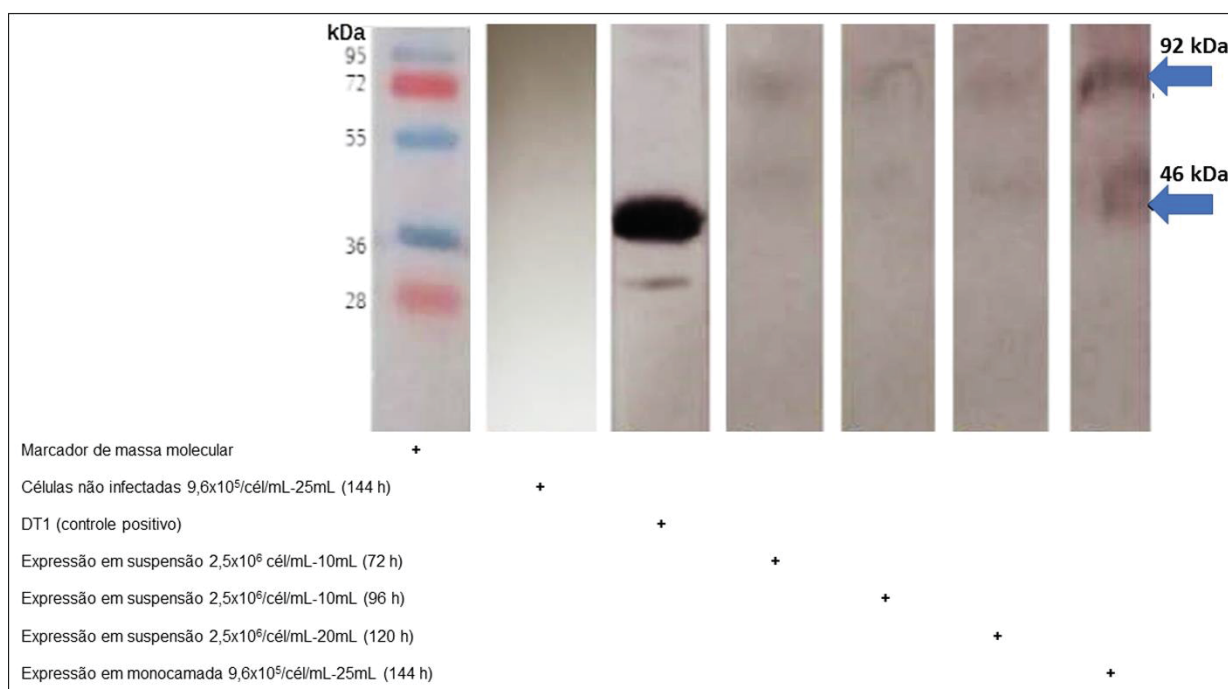
TABELA 1 – RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LSPILT

Expressão em garrafa 150 cm ² (Nº de células por mL: 9,6x10 ⁵ /25 mL)			
Porcentagem do P4	1%	2,5%	5%
Tempo de expressão em horas	144	144	144
Volume concentrado 12 X (25 mL): 2 mL			
Expressão em suspensão (Erlenmeyer) (Nº de células por mL: 2,5x10 ⁶ /40 mL)			
Porcentagem do P4	5%		
Porcentagem do P4 (fracionado durante os dias de expressão)	1º dia (2,5%) 2º dia-24 h (2,5%)		
Tempo de expressão em horas	72 h (10 mL) 96 h (10 mL), 120 h (20 mL)		
Viabilidade celular em 120 horas	21%		
Volumes concentrados 12 X (10 mL): 800 µL (20 mL): 1,6 mL			
Expressão em suspensão (Erlenmeyer) (Nº de células por mL: 3,5x10 ⁶ /500 mL)			
Porcentagem do P4	5%		
Porcentagem do P4 (fracionado durante os dias de expressão)	1º dia (2%) 4º dia-96 h (2%) 6º dia-144 h (1%)		
Tempo de expressão total em horas	192		
Viabilidade celular em 192 horas	40%		
Rendimento da purificação por cromatografia de afinidade: 4 mg (8 mg/L)			

FONTE: A autora.

Para avaliar a expressão da LSPILT, nos ensaios de padronização, foi feito SDS-PAGE e *western blotting* (FIGURA 8). Para confirmar a presença da LSPILT foi usado anticorpo antiveneno (1:1500) produzido em coelhos a partir do veneno bruto de *L. intermedia* e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:5000). Os resultados mostraram que a LSPILT faz interações intermoleculares, provavelmente formando dímeros, visto que, nos ensaios de padronização foram observadas duas bandas reconhecidas pelo anticorpo, uma banda na altura esperada LSPILT monomérica com ($\cong 46$ kDa) e outra banda com ($\cong 92$ kDa) essa que, provavelmente seja uma conformação dimérica.

FIGURA 8 – ENSAIO DE IMMUNOBLOTTING PARA VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LSPILT



FONTE: A autora.

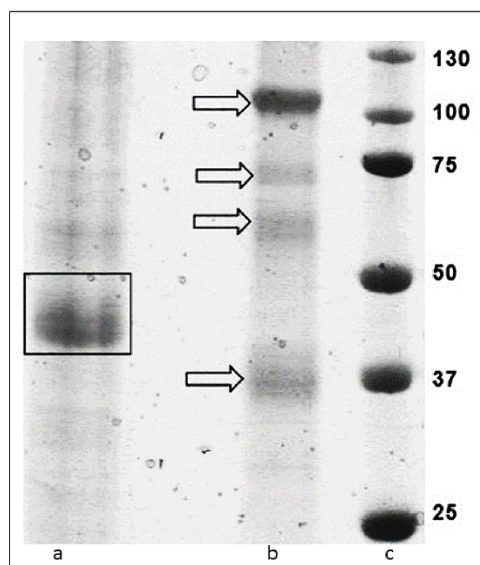
LEGENDA: Gel a 12,5%. As amostras não purificadas foram concentradas 12 X. Em cada poço foram adicionados 60 μ L das amostras concentradas e submetidas a eletroforese em condições redutoras. Destaque nas setas em azul para duas bandas que foram reconhecidas pelo anticorpo antiveneno de *L. intermedia*.

As expressões da LSPILT em volumes acima de 200 mL foram purificadas por cromatografia de afinidade (dados mostrados no capítulo 1). Para analisar o perfil da expressão da LSPILT purificada foi feito SDS-PAGE e duas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. Uma amostra foi reduzida (FIGURA 9a) e a outra amostra foi mantida em condições, não reduzida (FIGURA 9b).

A amostra que foi reduzida teve um perfil de deslocamento no gel mais homogêneo, formando uma única banda na altura esperada da LSPILT monomérica

com aproximadamente 46 kDa (FIGURA 9a), entretanto, a amostra não reduzida com as interações intermoleculares mantidas, mostrou um perfil de migração no gel mais heterogêneo, onde apenas uma parte da amostra apresentou uma banda na altura aproximada de LSPILT monomérica, ficando evidente a formação dimérica na conformação nativa da LSPILT na altura aproximada de 100 kDa (FIGURA 9b).

FIGURA 9 – GEL DE ELETROFORESE A 12,5%



FONTE: A autora.

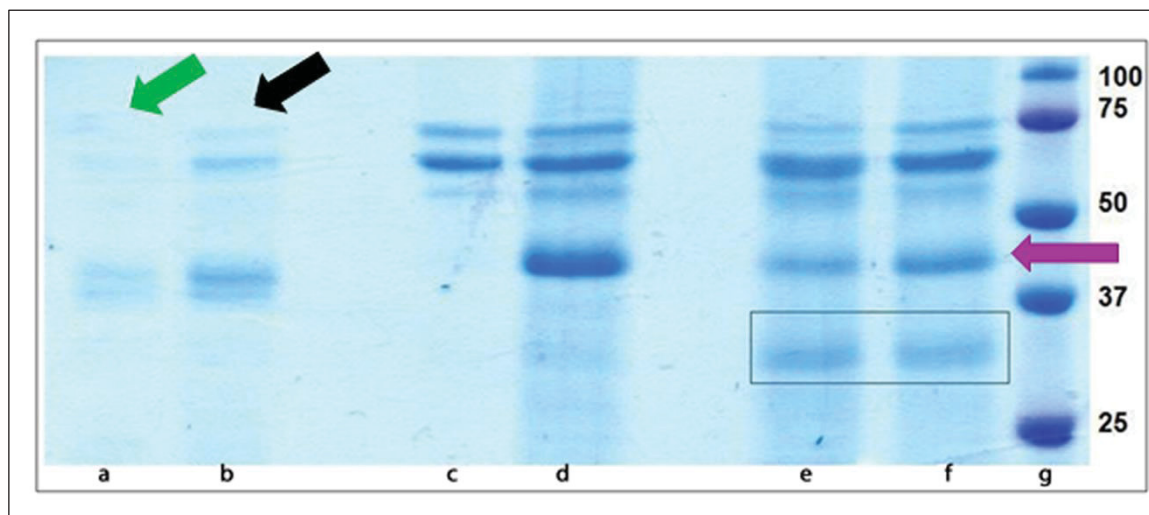
LEGENDA: a) 5 µg de LSPILT purificada, amostra reduzida. b) 5 µg de LSPILT purificada, amostra não reduzida. c) Marcador de massa molecular. Destaque nas setas para a amostra da LSPILT não reduzida mostrando possíveis interações intermoleculares, onde a migração molecular foi mais heterogênea. Destaque para o retângulo que mostra a amostra reduzida.

Após os ensaios que confirmaram a presença e atividade biológica da LSPILT por *immunoblotting* e zimograma reverso respectivamente (dados mostrados no capítulo 1) foram feitos testes de atividade biológica qualitativa da LSPILT contra a tripsina (FIGURA 10) analisando assim a inibição da degradação da tripsina sobre a vitronectina na presença da LSPILT. Para tanto, amostras de 5 µg de LSPILT foram pré-incubadas com 0,1 µg de tripsina por 30 min, a 37 °C antes da incubação com 5 µg de vitronectina, um substrato proteico aleatório. As incubações foram de 2 e 24 h e os controles também foram feitos nas mesmas condições, na ausência de LSPILT.

Após as incubações, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE sob condições redutoras. As FIGURAS 10e e 10f mostram que LSPILT teve atividade inibitória sobre a tripsina inibindo a proteólise da vitronectina. Além disso, o ensaio mostrou que a inibição da atividade da tripsina foi estável até 24 h (FIGURA 10e). No controle positivo (FIGURA 10b) a vitronectina foi em grande parte degradada em 2 h

de tratamento com a tripsina, sendo que em 24 h a vitronectina foi totalmente degradada como mostra a (FIGURA 10a).

FIGURA 10 – GEL DE ELETROFORESE A 12,5%, ENSAIO QUALITATIVO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA TRIPSINA SOBRE A VITRONECTINA PELA LSPILT



FONTE: A autora.

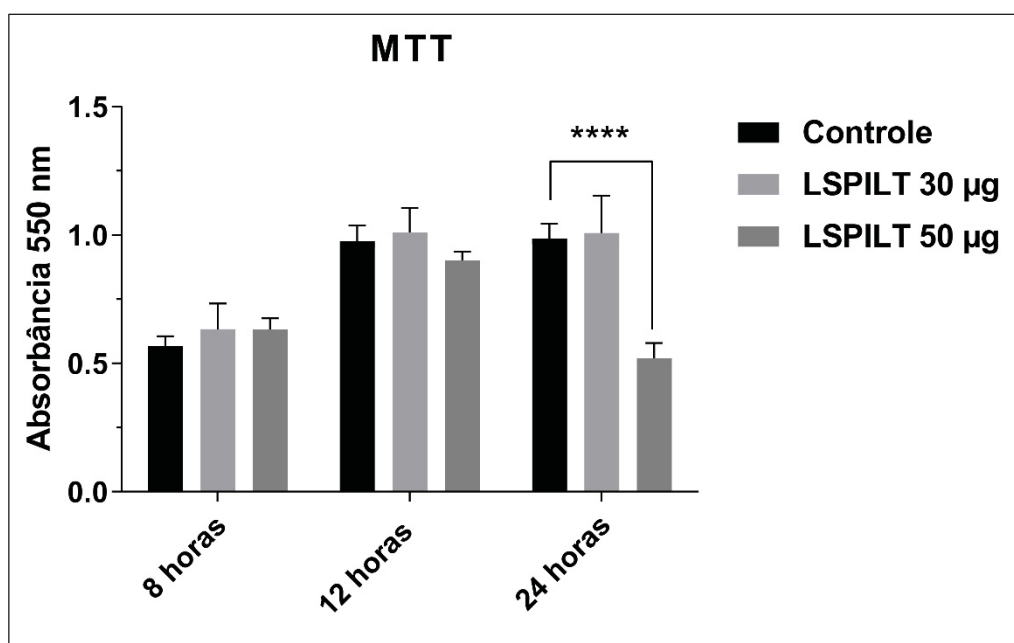
LEGENDA: a) Controle positivo: Vitronectina 5 µg, tripsina 0,1 µg (24 h de incubação). Destaque para seta verde onde mostra a degradação total da vitronectina na ausência de LSPILT. b) Controle positivo: Vitronectina 5 µg, tripsina 0,1 µg (2 h de incubação). Destaque para seta preta, onde mostra presença da degradação da vitronectina na ausência de LSPILT. c) Controle da estabilidade molecular, vitronectina 5 µg (incubação por 24 h). d) Controle de estabilidade molecular, vitronectina 5 µg e LSPILT 5 µg (24 h de incubação). e) Tratamento 1: Vitronectina 5 µg, tripsina 0,1 µg, LSPILT 5 µg (24 h de incubação). f) Tratamento 2: Vitronectina 5 µg, tripsina 0,1 µg, LSPILT 5 µg (2 h de incubação). Destaque para a seta rosa mostrando uma banda com a presença da LSPILT que inibiu a ação da tripsina sobre a vitronectina. g) Marcador de massa molecular. Controles e tratamentos foram submetidos a tampão ótimo e temperatura de 37 °C. Destaque para o retângulo, que mostra pequenas frações de moléculas degradadas.

Confirmada a evidência de que LSPILT tem atividade anti-serino proteásica, foram feitos ensaios para quantificar a inibição de LSPILT, para essa detecção foi usado um kit com gelatina de pele de porco conjugada a fluoresceína que serviu de substrato para a enzima tripsina, e foi possível quantificar a atividade de LSPILT (dados publicados no capítulo 1).

No capítulo 1 foi feita uma triagem em busca das atividades biológicas de LSPILT que inibiu a tripsina, inibiu a atividade da trombina na formação de coágulos e inibiu a atividade do sistema complemento na morte de *T. cruzi* ainda mostrou evidência de atividade antitumoral no ensaio de inibição da migração em células B16-F10 no ensaio *in vitro*. Foi feito também um ensaio de viabilidade em células B16-F10 por MTT (FIGURA 11). O resultado desse ensaio mostrou que o tratamento com 50 µg de LSPILT diminuiu a viabilidade das células B16-F10 de forma significativa comparado com o controle em 24 h de exposição. Para melhor entender esse efeito

da LSPILT em células tumorais será necessário fazer outros métodos de avaliação da viabilidade e proliferação tais como, vermelho neutro, cristal violeta entre outros métodos, o uso de um conjunto de métodos dará uma resposta robusta para esse indício de resposta que foi verificado pelo método do MTT, ficando como expectativa para novos trabalhos aprofundar a busca por atividades dessa molécula e suas aplicações biotecnológicas.

FIGURA 11 – EFEITO DA LSPILT NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10



FONTE: A autora.

LEGENDA: As células ($3,5 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas com 30 e 50 µg/poço de LSPILT por 8, 12 e 24 h a 37°C. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT. Os resultados foram expressos pelas médias das amostras em pentaplicata \pm SEM. Foram realizados três experimentos independentes. **** $p < 0,0001$.

8 DISCUSSÃO

Para a obtenção da LSPILT foram feitos diversos ensaios de padronização. Essas padronizações mostraram que volumes baixos de expressão não são suficientes para obter a proteína em quantidade de massa para ensaios biológicos. (FIGURA 8 e TABELA 1). Os primeiros ensaios de expressão foram feitos em placas, garrafas e em suspensão em volumes baixos de expressão, as amostras foram concentradas em centrífuga a vácuo refrigerada porque inicialmente não foi detectada a LSPILT no sobrenadante da expressão, só quando o sobrenadante foi concentrado 12 X foi possível detectar a LSPILT em ensaio de *immunoblotting* com anticorpos específicos que reconhecem as proteínas do veneno de *L. intermedia* (FIGURA 8).

Esse anticorpo reconheceu duas bandas nessas amostras reduzidas, o que provavelmente seja a conformação dimérica da proteína e esteja ocorrendo interações intermoleculares durante o processo da expressão, e mesmo as condições redutoras não foram suficientes para reduzir completamente as moléculas das amostras, provavelmente é por isso que aparecem duas bandas, uma na altura esperada para a conformação da LSPILT monomérica 46 kDa e outra banda na altura de uma conformação dimérica 92 kDa (FIGURA 9). Volumes de expressão acima de 300 mL foram adequados para a obtenção da LSPILT, esses volumes foram purificados por cromatografia de afinidade em Níquel-Agarose usando sistema automatizado, a pureza da proteína ficou acima de 90 % (FIGURA 9a). Amostras reduzidas e não reduzidas da LSPILT purificada submetidas a eletroforese (FIGURA 9) mostram que em condições redutoras a proteína purificada teve um deslocamento homogêneo no gel e a banda ficou na altura esperada para a LSPILT monomérica, já a amostra que não foi reduzida teve um deslocamento mais heterogêneo no gel formando bandas intermediárias e uma banda na altura esperada para um dímero, isso evidencia mais uma vez o que provavelmente sejam interações intermoleculares que estão ocorrendo durante o processo de expressão.

Além do volume da expressão outra variável testada e que foi imprescindível para o sucesso da produção de LSPILT foi fracionar o volume do sobrenadante de alta titulação viral P4. O título viral quantificado por RT-qPCR foi de 1×10^7 cópias virais/mL, alguns autores obtiveram uma titulação viral semelhante, sendo 1.0–

2.0×10^7 cópias virais/mL para o P2 (JAYAKUMAR, 2004). Com o resultado da titulação viral obtida foi possível calcular a MOI/mL, cálculo disponível no manual do fabricante que permite quantificar o título viral e relacionar a porcentagem. Nesse trabalho foi realizado uma normalização em porcentagem do título viral por mL.

A MOI é uma das mais importantes variáveis no processo de produção de baculovírus recombinante, e é definido como o número de partículas infecciosas adicionadas na cultura. MOIs baixas (< 1 pfu/célula) levam a infecção de apenas uma pequena proporção da população total de células em cultura e é frequentemente referida como infecção assíncrona. MOIs altas (> 3 pfu/célula) no entanto, podem levar toda a população de células a ser infectadas simultaneamente, o que é referido como uma infecção síncrona (AUCOIN; MENA; KAMEN, 2010). MOI entre 5 e 10 foram usadas por alguns autores (JAYAKUMAR, 2004; USAMI *et al.*, 2010; KLAUS *et al.*, 2015) entretanto, existem diferentes opiniões no que se refere a MOI, alguns autores consideram que uma MOI entre 1 e 20 levam a níveis essencialmente semelhantes de produtividade (MAIORELLA *et al.*, 1988) enquanto outros autores afirmam que uma MOI próximo a 1 é suficiente e efetiva para a expressão de proteínas recombinantes (AGATHOS, 1996). Nesse trabalho foi padronizado o uso de uma MOI de 5 equivalente a 5% do volume do sobrenadante P4 e com uma adição fracionada desse sobrenadante na cultura de expressão. O melhor resultado obtido em quantidade de massa da molécula recombinante foi quando a adição do sobrenadante de alta titulação viral foi feita em três dias diferentes, durante o período de expressão. No 1º dia da expressão foi adicionado 2% do volume do P4, no 4º dia foi adicionado 2% do volume do P4 e no 6º dia 1% do volume do P4 essa estratégia levou uma resposta mais lenta da perda da viabilidade celular, sendo que, com 192 h de expressão ainda foi constatado que 40% das células estavam viáveis e sobretudo, produzindo a LSPILT, ao contrário do que foi observado quando foi adicionado o total da titulação viral, ou seja, 5% do P4 na hora zero da expressão porque em apenas 144 h de expressão todas as células já estavam inviáveis e não teve produção da LSPILT. Isso levou a conclusão de que para a produção da LSPILT é importante fazer uma exposição gradual da titulação viral o que determina uma infecção mais lenta da cultura celular, e provavelmente uma resposta celular mais efetiva na síntese proteica.

A produção de LSPILT em células de inseto, nas condições já descritas, foi bem expressiva, chegando a 8 mg/L, trabalhos recentes onde foram usados o mesmo sistema de expressão tiveram uma produção bem menos expressiva. MOUREZ *et al.*,

(2007) obtiveram um total de 0,5 mg de uma proteína recombinante do capsídeo de uma cepa de coronavírus humano. JUSTA *et al.*, (2020) obtiveram 0,5 mg/L de um alérgeno do veneno *L. intermedia* e DE-BONA *et al.*, (2021) obtiveram 1 mg/L de uma hialuronidase do veneno de *L. intermedia*. No entanto, outra serpina que foi expressa em células de inseto resultou em 2 a 3 mg em 300 mL uma proporção de 6,6 a 10 mg/L (JAYAKUMAR, 2004) a produção em massa dessa serpina ficou muito próxima a quantidade de expressão em massa de LSPILT. A partir dessa informação é possível inferir que as serpinas sejam moléculas com características que favorecem a sua expressão em células de inseto. Uma hipótese que explica essa maior expressão das serpinas nesse modelo de expressão é que muito provavelmente essas moléculas não são degradadas durante o processo de expressão.

A LSPILT mostrou atividade anti-proteolítica contra a tripsina na degradação da vitronectina, uma molécula de matriz extracelular. Esse foi um dos primeiros ensaios que mostrou o sucesso da expressão da LSPILT em células de inseto, mostrado pelo ensaio qualitativo de inibição da tripsina (FIGURA 10), que a LSPILT estava sendo expressa na forma ativa. Esse foi o marco zero desse trabalho, de onde iniciou-se a investigação na busca por atividades biológicas e bioquímicas em sistemas que são regulados por serino protease, nesse ensaio inicial a serpina recombinante mostrou alta taxa de inibição da atividade da tripsina, restando apenas pequenas frações de moléculas, mostrado nas FIGURAS 10e e 10f, que parecem degradadas, para identificar essas pequenas frações seria interessante fazer imuno ensaios com anticorpos específicos que reconhecessem essas frações, uma hipótese é que possam ser frações da vitronectina que degradou.

Sabendo que serpinas têm atividade antitumoral, como por exemplo a maspina, que inibiu a migração de células endoteliais *in vitro* em uma concentração entre 0,5 e 1 μ M (ZHANG *et al.*, 2000) e nessas mesmas concentrações, a maspina também inibiu a motilidade e a invasão das células tumorais (SHENG *et al.*, 1996) células B16-F10 foram expostas ao tratamento com LSPILT e foi possível detectar a diminuição da viabilidade dessas células em 24 h de tratamento (FIGURA 11) no entanto, serão necessários outros métodos de avaliação da viabilidade e proliferação nessas células para aprofundar de que forma ocorre essa interferência da LSPILT na viabilidade dessas células tumorais. Foi investigado também o potencial antimigratório da LSPILT em células B16-F10 (dados mostrados no capítulo I) o ensaio mostrou que a LSPILT inibiu a migração dessas células tumorais, isso se deve provavelmente, a inibição de

serino proteases que estão envolvidas no processo de migração dessas células, a tripsina por exemplo, está envolvida na carcinogênese colorretal e promove proliferação, invasão e metástase (YAMAMOTO *et al.*, 2003; SOREIDE *et al.*, 2006) portanto, uma hipótese é que a LSPILT esteja inibindo atividade da tripsina ou outras serino proteases que estejam sendo expressas em células B16-F10 e que promovem a migração dessas células, assim como nesse trabalho, outros autores também mostraram a atividade antitumoral de serpinas, como a superexpressão de uma serpina, a SERPINB1, que em células de glioma apresentou atividade regulatória negativa na migração e invasão dessas células, mediado via inativação da fosforilação de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) que está envolvida na regulação negativa da expressão de MMP-2. Essa alta expressão de SERPINB1 mostrou estar associada a um bom prognóstico em glioma (HUASONG *et al.*, 2015). O descontrole da atividade de proteases, como as serino proteases, levam a mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz e novos sinais são geradas na superfície celular, esses sinais afetam a expressão gênica influenciando processos tais como, sobrevivência, proliferação, diferenciação e motilidade celular (DECLERCK *et al.*, 2004).

Como foi mostrado nos dois capítulos dessa tese a LSPILT tem uma plasticidade de inibição, ou seja, mostrou ser um inibidor de múltiplas proteases, outros autores encontraram funções múltiplas em outras serpinas, um inibidor de proteína C é multifuncional com ampla atividade inibidora de protease (LI *et al.*, 2007) uma serpina de planta mostrou dualidade de função (COHEN; DAVYDOV; FLUHR, 2019).

Serão necessários mais estudos para o aprofundamento do entendimento das atividades biológicas de LSPILT e a detecção de possíveis aplicações biotecnológicas dessa molécula, aqui propomos que no futuro a LSPILT poderá vir a ser um novo fármaco para tratar não só doenças que causam desordem no sistema de coagulação, mas também, e principalmente, atuar no tratamento contra o câncer, visto que, outros estudos mostram que as serpinas têm atividade antitumoral (ZHANG *et al.*, 2000; SCHAEFER; ZHANG, 2005) e atividade anticoagulante (CARNEIRO-LOBO *et al.*, 2009; KEIZER *et al.*, 2015; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2016). Estudos recentes mostraram também que moléculas inibidoras de serino protease abrandaram a patogênese do SARS-CoV-2 em modelo *in vivo* (HOFFMANN *et al.*, 2020) baseado nessa amplitude de alvos moleculares, inibidores de serino protease das aranhas do gênero *Loxosceles* devem ser também objeto de estudo com potencial antiviral.

9 CONCLUSÕES

Foi feita a clonagem, padronização, expressão e purificação de uma toxina recombinante do veneno de aranha marrom da espécie *L. intermedia* identificada como uma serpina. A expressão foi feita em modelo eucarioto em linhagem de células de inseto, *Spodoptera frugiperda* (Sf9). A molécula que foi obtida recebeu o nome de LSPILT (do Inglês *L*oxosceles *S*erine *P*rotease *I*nhibitor-*L*ike *T*oxin). Os ensaios de padronização da síntese dessa proteína mostraram que o fracionamento da adição da titulação viral foi imprescindível para o rendimento da expressão da LSPILT que foi de 8 mg/L.

Os dados obtidos a partir da realização dessa pesquisa permitiram a caracterização bioquímica e biológica inicial da LSPILT. Tanto os dados qualitativos como os quantitativos mostram atividade inibitória da LSPILT sobre a tripsina, inibindo a atividade proteolítica dessa serino protease. A LSPILT inibiu a formação de trombo induzida pela trombina também inibiu convertases, serino proteases que modulam o sistema complemento, essas convertases atuam na lise de *Trypanosoma cruzi*. LSPILT ainda inibiu serino proteases envolvidas na migração celular de melanoma B16-F10. Os dados *in vitro* da atividade antimigratória e de viabilidade em células B16-F10 mostraram evidências do potencial antitumoral da LSPILT.

Foram produzidos anticorpos policlonais em camundongos suíços, esses anticorpos reconheceram a LSPILT purificada e reconheceram a serpina nativa no veneno total de três espécies de aranha marrom, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha* mostrando a homologia e conservação dessa molécula nas três espécies. A sequência nucleotídica da LSPILT foi analisada quanto a sua similaridade com outras sequências depositadas, das seis sequências mais similares, cinco sequências são de aranhas e uma de caranguejo, o que mostra a conservação dessas serpinas em outras espécies de aranhas.

Serão necessários mais estudos para o aprofundamento do entendimento das atividades biológicas e bioquímicas da LSPILT e a detecção de possíveis aplicações biotecnológicas dessa molécula.

Apesar do período de pandemia do Covid-19 enfrentado durante a realização desse trabalho, foi possível finalizá-lo com excelência deixando valiosas contribuições para a comunidade científica e para a população brasileira que financiou essa pesquisa.

10 REFERÊNCIAS

- ACÁCIO, C. N. L. Análise Citopatológica de Células de Inseto Infectadas com Baculovírus Mutantes. [s. l.], 2008.
- AGATHOS, S. N. Insect cell bioreactors. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 1–3, p. 173–189, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00350398>
- ALCANTARA, M. B.; DASS, C. R. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by the serpin PEDF: A promising new target for metastatic cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 4–5, p. 487–494, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1159/000350069>
- APPEL, M. H. *et al.* Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 152–158, 2005.
- APPEL, M. H. *et al.* Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1780, n. 2, p. 167–178, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.007>
- ASSUMPÇÃO, T. C. *et al.* In Vitro Mode of Action and Anti-thrombotic Activity of Boophilin, a Multifunctional Kunitz Protease Inhibitor from the Midgut of a Tick Vector of Babesiosis, *Rhipicephalus microplus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. e0004298, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004298>
- AUCOIN, M. G; MENA, A. J.; KAMEN, A. A. Bioprocessing of Baculovirus Vectors: A Review. **Current Gene Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 174–186, 2010. Available at: <https://doi.org/10.2174/156652310791321288>
- BABCOCK, J. L.; MARMER, D. J.; STEELE, R. W. Immunotoxicology of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 783–790, 1986. Available at: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90103-0)
- BAO, J. *et al.* Serpin functions in host-pathogen interactions. **PeerJ**, [s. l.], v. 6, p. e4557, 2018. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.4557>
- BEINROHR, L. *et al.* Serpins and the Complement System. *In*: [S. l.: s. n.], 2011. p. 55–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386471-0.00004-3>
- BERG, T. Small-Molecule Inhibitors of Protein–Protein Interactions. *In*: PROTEIN-PROTEIN COMPLEXES. [S. l.]: IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2010. p. 318–339. Available at: https://doi.org/10.1142/9781848163409_0012
- BHAKUNI, T. *et al.* Role of heparin and non heparin binding serpins in coagulation and angiogenesis: A complex interplay. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 604, p. 128–142, 2016a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.018>
- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. *In* **Virus of Invertebrates** (pp.1-72). Routledge, 1991.
- BORGES, M. H. *et al.* Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula

Grammostola iheringi: Searching for potential biotechnological applications. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 136, p. 35–47, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.013>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

CARNEIRO-LOBO, T. C. *et al.* Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1855–1864, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03553.x>

CARRELL, R. *et al.* Dysfunctional Variants and the Structural Biology of the Serpins. *In*: [S. l.: s. n.], 1997. p. 207–222. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5391-5_20

CARRELL, R. W.; READ, R. J. How serpins transport hormones and regulate their release. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 62, p. 133–141, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.12.007>

CASTRO-GUILLÉN, J. L.; GARCÍA-GASCA, T.; BLANCO-LABRA, A. **Protease inhibitors as anticancer agents**. [S. l.: s. n.], 2011.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. **Toxins**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 309–344, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins3030309>

CHAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 89, n. 17, p. 1260–1270, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/89.17.1260>

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Brown spider (*Loxosceles*) venom toxins as potential biotools for the development of novel therapeutics. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins11060355>

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 655–666, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.22148>

CHLASTÁKOVÁ, A. *et al.* Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From *Ixodes ricinus* Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties In Vitro. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626200>

CHOU, W.-M. *et al.* Structure–function studies on inhibitory activity of *Bungarus multicinctus* protease inhibitor-like protein on matrix metalloproteinase-2, and invasion and migration of human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Toxicon**, [s. l.], v. 55, n. 2–3, p. 353–360, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.012>

CHRISTELLER, J.; LAING, W. Plant Serine Proteinase Inhibitors. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 439–447, 2005. Available at:

<https://doi.org/10.2174/0929866054395329>

CICARDI, M. *et al.* C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. **Springer Seminars in Immunopathology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 286–298, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00281-005-0001-4>

CODDINGTON, D. A.; HISNANICK, J. J. Clinical Characteristics of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus among Southwestern American Indian Youths. **Journal of Health Population and Nutrition**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 12–17, 2001. Available at: <https://doi.org/10.3329/jhpn.v19i1.68>

COHEN, M.; DAVYDOV, O.; FLUHR, R. Plant serpin protease inhibitors: specificity and duality of function. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 70, n. 7, p. 2077–2085, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery460>

COLLER, B. S. *et al.* Deficiency of plasma protein S, protein C, or antithrombin III and arterial thrombosis. **Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 456–462, 1987. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.7.5.456>

CONARD, J.; SAMAMA, M. Inhibitors of Coagulation, Atherosclerosis, and Arterial Thrombosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [s. l.], v. 12, n. 02, p. 87–90, 1986. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1003540>

COUVREUR, B. *et al.* Variability and Action Mechanism of a Family of Anticomplement Proteins in *Ixodes ricinus*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e1400, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001400>

DA SILVA, P. H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 758–768, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.024>

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, [s. l.], v. 88, n. 9, p. 1241–1253, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>

DANNEELS, E. L.; RIVERS, D. B.; DE GRAAF, D. C. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 494–516, 2010. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins2040494>

DARMOUL, D. *et al.* Protease-activated Receptor 2 in Colon Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 20, p. 20927–20934, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M401430200>

DAVIES, M. J.; LOMAS, D. A. The molecular aetiology of the serpinopathies. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 40, n. 6–7, p. 1273–1286, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.017>

DE-BONA, E. *et al.* Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], p. 109759, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109759>

DE ANDRADE, R. M. G. *et al.* Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 627–632, 1999. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00200-1)

DE OLIVEIRA, K. C. *et al.* Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 217–221, 1999. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00130-5)

DECLERCK, Y. A. *et al.* Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer: a Workshop of the Path B Study Section. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1131–1139, 2004. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63200-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63200-2)

DEU, E.; VERDOES, M.; BOGYO, M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 9–16, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2203>

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1002/iub.186>

DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 347–352, 1998. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01254-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01254-7)

DOMANN, F. E. *et al.* Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 805–810, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000315\)85:6<805::AID-IJC12>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000315)85:6<805::AID-IJC12>3.0.CO;2-5)

DOOLITTLE, R. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. **Science**, [s. l.], v. 222, n. 4622, p. 417–419, 1983. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.6604942>

FERNANDES-PEDROSA, M. de F. *et al.* Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 9, p. 1–12, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>

FERRER, V. P. *et al.* A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e2206, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 304, n. 4, p. 261–267, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1097/00000441-199210000-00008>

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 4751–4803, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr010170+>

GETTINS, P.; PATSTON, P. A.; SCHAPIRA, M. Structure and Mechanism of Action of Serpins. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1393–1408, 1992. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(18\)30282-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(18)30282-X)

GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V.

Comparison of the Fertility Between *Loxosceles Intermedia* and *Loxosceles Laeta* Spiders (Araneae, Sicariidae). **Journal of Arachnology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 245–247, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1636/0161-8202\(2000\)028\[0245:cotfbl\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1636/0161-8202(2000)028[0245:cotfbl]2.0.co;2)

GREMSKI, L. H. *et al.* Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 120–134, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.002>

GREMSKI, L. H. *et al.* A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 2403–2416, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1039/c004118a>

GREMSKI, L. H. *et al.* Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 27, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0188>

GREMSKI, L. H. *et al.* Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 164, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins12030164>

GREMSKI, L. H. *et al.* Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, [s. l.], v. 83, p. 91–120, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>

GREMSKI, L. H. Análise do transcriptoma da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha-marrom): perfil de expressão e identificação de novas toxinas. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.

HARLOW, Ed.; LANE, D. “A laboratory manual.” **Cold Spring Harbor Laboratory**, [s. l.], v. 579, 1988. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/2/4/local/back-matter.pdf>

HARPER, D. M. *et al.* Sustained efficacy up to 4·5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 367, n. 9518, p. 1247–1255, 2006. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68439-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68439-0)

HEAL, W.; WICKRAMASINGHE, S.; TATE, E. Activity Based Chemical Proteomics: Profiling Proteases as Drug Targets. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 200–212, 2008. Available at: <https://doi.org/10.2174/157016308785739866>

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr000033x>

HEUTINCK, K. M. *et al.* Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 11–12, p. 1943–1955, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.020>

HIROTA, C. L. *et al.* Epidermal growth factor receptor transactivation is required for proteinase-activated receptor-2-induced COX-2 expression in intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, [s. l.], v.

- 303, n. 1, p. G111–G119, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00358.2011>
- HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- HUASONG, G. *et al.* Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 suppresses cell migration and invasion in glioma cells. **Brain Research**, [s. l.], v. 1600, p. 59–69, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.017>
- HUNTINGTON, J. A. Serpin structure, function and dysfunction. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 9, n. 1 S, p. 26–34, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x>
- IBELLI, A. M. G. *et al.* A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 369–379, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.010>
- IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 1–20, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>
- IRONS, S. L. *et al.* Protein Production using the Baculovirus Expression System. **Current Protocols in Protein Science**, [s. l.], v. 91, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/cpps.45>
- IRVING, J. A. *et al.* Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. **Genome Research**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1845–1864, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.GR-1478R>
- ISHIGURO, K. *et al.* Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 106, n. 7, p. 873–878, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI10489>
- JANCIAUSKIENE, S. M. *et al.* The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 105, n. 8, p. 1129–1139, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.02.002>
- JAYAKUMAR, A. Production of serpins using baculovirus expression systems. **Methods**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 177–184, 2004. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00209-3)
- JEDLIČKOVÁ, L. *et al.* A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement in vitro. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 337–346, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.010>
- JESSE, S. *et al.* Differential Sialylation of Serpin A1 in the Early Diagnosis of Parkinson's Disease Dementia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048783>
- JIANG, N. *et al.* Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. **Oncogene**, [s. l.], v. 21, n. 26, p. 4089–4098, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205507>

JOINER, K. A. Complement Evasion by Bacteria and Parasites. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 201–230, 1988. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.001221>

JUSTA, H. C. da *et al.* LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 3984–3999, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.212>

KANOST, M. R. Serine Protease Inhibitors from the Serpin Gene Family in *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. In: MOLECULAR INSECT SCIENCE. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 139–146. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3668-4_17

KATSUKAWA, M. *et al.* Serpin Facilitates Tumor-Suppressive Cell Competition by Blocking Toll-Mediated Yki Activation in *Drosophila*. **Current Biology**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1756–1767.e6, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.022>

KEIZER, M. P. *et al.* TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 544–550, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.201445070>

KEMPER, C.; PANGBURN, M. K.; FISHELSON, Z. Complement Nomenclature 2014. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 56–58, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.07.004>

KIM, J. *et al.* Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. **Cell**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 353–362, 1998. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81478-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81478-6)

KIM, T. K. *et al.* Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 45, n. 9–10, p. 613–627, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.03.009>

KLAUS, T. *et al.* Overcoming inefficient secretion of recombinant VEGF-C in baculovirus expression vector system by simple purification of the protein from cell lysate. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 110, p. 151–158, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.001>

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 567–575, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt1095>

KREM, M. M. DI CERA, E. Molecular markers of serine protease evolution. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 3036–3045, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3036>

KROWARSCHE, D. *et al.* Canonical protein inhibitors of serine proteases. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 2427–2444, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3120-x>

KUESTER, D. *et al.* The cathepsin family and their role in colorectal cancer. **Pathology - Research and Practice**, [s. l.], v. 204, n. 7, p. 491–500, 2008. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2008.04.010>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Available at: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LANTZ, M. S.; CIBOROWSKI, P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *In*: [S. l.: s. n.], 1994. p. 563–594. Available at: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35171-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35171-6)

LARIONOVA, N. V. *et al.* Preparation and Characterization of Microencapsulated Proteinase Inhibitor Aprotinin. **Biochemistry (Moscow)**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 857–862, 1999.

LARSSON, H. *et al.* Antiangiogenic effects of latent antithrombin through perturbed cell-matrix interactions and apoptosis of endothelial cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 23, p. 6723–6729, 2000.

LAW, R. H. P. *et al.* An overview of the serpin superfamily. **Genome Biology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1–11, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-216>

LI, X. *et al.* Endogenous Inhibition of Histone Deacetylase 1 by Tumor-Suppressive Maspin. **Cancer Research**, [s. l.], v. 66, n. 18, p. 9323–9329, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1578>

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>

LOCHTER, A. *et al.* Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 1861–1872, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1861>

LU, Z.; WANG, F.; LIANG, M. SerpinC1/Antithrombin III in kidney-related diseases. **Clinical Science**, [s. l.], v. 131, n. 9, p. 823–831, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1042/CS20160669>

LYSVAND, H. *et al.* Psoriasis pathogenesis – Pso p27 constitutes a compact structure forming large aggregates. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 2, p. 132–136, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.06.001>

MACHADO, L. F. *et al.* Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **PROTEOMICS**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 2167–2176, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.200401096>

MAIORELLA, B. *et al.* Large-Scale Insect Cell-Culture for Recombinant Protein Production. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1406–1410, 1988. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt1288-1406>

MÁLAQUE, C. M. S. *et al.* Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 139–143, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000300005>

MATSUBARA, F. H. *et al.* A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, [s. l.], v. 71, p. 147–158, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.014>

MIKA, A. *et al.* Novel *Scabies Mite* Serpins Inhibit the Three Pathways of the Human Complement System. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. e40489, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040489>

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1705, n. 2, p. 69–89, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.09.006>

MOUREZ, T. *et al.* Baculovirus expression of HCoV-OC43 nucleocapsid protein and development of a Western blot assay for detection of human antibodies against HCoV-OC43. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 175–180, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.09.024>

NASIMUZZAMAN, M.; VAN DER LOO, J. C. M.; MALIK, P. Production and purification of baculovirus for gene therapy application. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2018, n. 134, p. 1–6, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3791/57019>

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 268–271, 1989. Available at: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90061-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90061-3)

NORRIS, K. A. *et al.* Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 147, n. 7, p. 2240–2247, 1991. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717552>

NYBERG, P. *et al.* MMP-9 Activation by Tumor Trypsin-2 Enhances in vivo Invasion of Human Tongue Carcinoma Cells. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 81, n. 12, p. 831–835, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1177/154405910208101207>

O'REILLY, M. S. *et al.* Antiangiogenic Activity of the Cleaved Conformation of the Serpin Antithrombin. **Science**, [s. l.], v. 285, n. 5435, p. 1926–1928, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1926>

O'REILLY, D. R.; BROWN, M. R.; MILLER, L. K. Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Host ecdysteroids are conjugated with galactose. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 313–320, 1992. Available at: [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(92\)90069-Q](https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90069-Q)

OTLEWSKI, J.; KROWARSCHE, D.; APOSTOLUK, W. Protein inhibitors of serine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 531–565, 1999. Available at: https://doi.org/10.18388/abp.1999_4128

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ O. T. Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System. [s. l.], n. 3, 2006.

PELTIER, J. *et al.* Quantitative proteomic analysis exploring progression of colorectal cancer: Modulation of the serpin family. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 148, p. 139–

148, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.031>

PODDAR, N. K.; MAURYA, S. K.; SAXENA, V. Role of Serine Proteases and Inhibitors in Cancer. *In: PROTEASES IN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY*. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 257–287. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-10-2513-6_12

PREVOT, P. P. *et al.* Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 36, p. 26361–26369, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604197200>

RAKASHANDA, S. *et al.* Role of proteases in cancer: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 90–101, 2012. Available at: <https://doi.org/10.5897/BMBR11.027>

RAU, J. C. *et al.* Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 5, p. 102–115, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x>

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 378, n. 3, p. 705–716, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj20031825>

REZAIE, A. R.; GIRI, H. Antithrombin: An anticoagulant, anti-inflammatory and antibacterial serpin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 528–533, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/jth.14724>

ROHRMANN, G. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. **Baculovirus Molecular Biology**, [s. l.], n. Figure 3, p. 1–32, 2013.

ROKYTA, D. R. *et al.* The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC Genomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 312, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-312>

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>

SADE, Y. B. *et al.* Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 170–177, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>

SCHAEFER, J. S.; ZHANG, M. Hypoxia effects: Implications for maspin regulation of the uPA/uPAR complex. **Cancer Biology and Therapy**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 1033–1035, 2005. Available at: <https://doi.org/10.4161/cbt.4.9.2057>

SCHEMCZSEN-GRAEFF, Z. *et al.* Description of a serpin toxin in *Loxosceles* (Brown spider) venoms: Cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 1607–1620, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.129>

SHELLENBERGER, T. D. *et al.* Headpin: A Serpin with Endogenous and Exogenous Suppression of Angiogenesis. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 24, p. 11501–11509, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2262>

SHENG, S. *et al.* Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 93, n. 21, p. 11669–11674, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11669>

SHI, X.; JARVIS, D. L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. **Current drug targets**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1116–1125, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13314>

SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas : Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, [s. l.], p. 108–119, 2009.

SIM, R. B.; LAICH, A. Serine proteases of the complement system. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 545–550, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1042/bst0280545>

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 2156–2165, 1983. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.3.12.2156>

SOREIDE, K. *et al.* Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 147–156, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.1999>

STERN, D. *et al.* Interaction of antithrombin III with bovine aortic segments. Role of heparin in binding and enhanced anticoagulant activity. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 272–279, 1985. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI111685>

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 213–221, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.006>

TREVISAN-SILVA, D. *et al.* Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, [s. l.], v. 76, p. 11–22, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>

USAMI, A. *et al.* Silkworm as a Host of Baculovirus Expression. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 246–250, 2010. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920110791112013>

VAN DER WILK, F.; VAN LENT, J. W. M.; VLAK, J. M. Immunogold Detection of Polyhedrin, p10 and Virion Antigens in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus-infected *Spodoptera frugiperda* Cells. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 2615–2623, 1987. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-10-2615>

VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 6–23, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>

VARELA, J. C.; TOMLINSON, S. Complement. **Hematology/Oncology Clinics of**

North America, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 409–427, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.02.001>

VEIGA, S. S. *et al.* Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 825–839, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00197-X)

VUITIKA, L. *et al.* Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 114, n. 11, p. 2479–2492, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.24594>

WALPORT, M. J. Complement. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 344, n. 14, p. 1058–1066, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>

WANG, D. *et al.* The role of serpin protein on the natural immune defense against pathogen infection in *Lampetra japonica*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 92, p. 196–208, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.062>

WANG, S. E. *et al.* Convergence of p53 and Transforming Growth Factor β (TGF β) Signaling on Activating Expression of the Tumor Suppressor Gene maspin in Mammary Epithelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 8, p. 5661–5669, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M608499200>

YAMAMOTO, H. *et al.* Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 199, n. 2, p. 176–184, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.1277>

YAN, L. *et al.* Layered double hydroxide nanostructures and nanocomposites for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 7, n. 37, p. 5583–5601, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9tb01312a>

YANG, L. *et al.* A transgenic rice seed accumulating an anti-hypertensive peptide reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 580, n. 13, p. 3315–3320, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.092>

YUAN, C.-H. *et al.* Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. e3414, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003414>

ZHANG, M.; MAGIT, D.; SAGER, R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive Ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 11, p. 5673–5678, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5673>

ZHANG, M. *et al.* Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 196–199, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1038/72303>

ZHANG, W. *et al.* Antiangiogenic Antithrombin Induces Global Changes in the Gene Expression Profile of Endothelial Cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 66, n. 10, p. 5047–5055, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4449>

ZOU, Z. *et al.* p53 Regulates the Expression of the Tumor Suppressor Gene Maspin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 9, p. 6051–6054, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6051>

ŽUPUNSKI, V.; KORDIŠ, D.; GUBENŠEK, F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 547, n. 1–3, p. 131–136, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00693-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00693-8)

ANEXO 1 – ARTIGO 1 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

International Journal of Biological Macromolecules 164 (2020) 3984–3999



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties



Hanna Câmara da Justa^a, Fernando Hitomi Matsubara^a, Elidiana de-Bona^a, Zelinda Schemczssen-Graeff^a, Nayanne Louise Costacurta Polli^a, Thiago Lopes de Mari^a, Marianna Boia-Ferreira^a, João Carlos Minozzo^b, Ana Carolina Martins Wille^c, Andrea Senff-Ribeiro^a, Luiza Helena Gremski^a, Silvio Sanches Veiga^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba 81530-900, PR, Brazil

^b Production and Research Center of Immunobiological Products, State Department of Health, Piraquara 83302-200, PR, Brazil

^c Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa 84030-900, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2020

Received in revised form 27 August 2020

Accepted 27 August 2020

Available online 30 August 2020

Keywords:

Loxosceles

Allergen

Baculovirus

ABSTRACT

Bites evoked by Brown spiders (*Loxosceles* genus) are associated with skin injuries (cutaneous rash, itching, swelling, erythema and dermonecrosis) and systemic manifestations. Transcriptome analyses of *Loxosceles* venom glands showed that the venom has a complex composition containing toxins such as phospholipases-D, metalloproteases and hyaluronidases. Here, by screening the RNA from *L. intermedia* venom glands, we cloned a novel allergen toxin, and named LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin). Sequence analysis showed that LALLT is closely related to allergens from other spiders and RNA screening indicated the presence of LALLT orthologues in the venom of other *Loxosceles* spiders. Recombinant LALLT was expressed (~45 kDa) in baculovirus-infected insect cells and purified by affinity chromatography. Antibodies against different *Loxosceles* venoms cross-reacted with LALLT and antibodies against LALLT recognized three *Loxosceles* venoms, revealing epitopes identity. LALLT triggered paw edema in mice and erythema, edema and leukocyte infiltration into the dermis of rabbit skin. Also, LALLT induced vascular permeability in mice, degranulation of rat mesenteric mast cells, as well as prompted degranulation and increased calcium influx in RBL-2H3 cells. Data reported suggest for the first time the existence of allergens in *Loxosceles* venoms and make LALLT available for clinical studies about allergenic events arisen by *Loxosceles* envenoming.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Accidents caused by bites of Brown spiders, named loxoscelism or necrotic arachnidism, are reported worldwide and constitute a public health problem in several countries. According to SINAN-Brazil (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) [1], only in 2019, spiders of the genus *Loxosceles* were responsible for most of the accidents in Brazil, corresponding to 8391 notified cases. Loxoscelism manifestations include skin lesions characterized by edema, erythema, itching and cutaneous rash surrounding the spider bite, which can evolve to necrotic lesions with gravitational spreading. Into a lesser extent, systemic manifestations can occur including hematological dysfunctions such as intravascular hemolysis, disseminated intravascular coagulation and acute renal failure [2–5].

The venom from *Loxosceles* spiders is a colorless liquid, enriched in proteins and glycoproteins, with a predominance of molecules ranging from 5 to 40 kDa [2–6]. Literature has described in the crude venom three families of highly expressed toxins designated as phospholipases-D (PLDs), metalloproteases (astacin-like proteases) and inhibitor cystine knot peptides (ICKs) [2,4,5,7–12]. Moreover, toxins with low level of expression, such as hyaluronidase, serine proteases, serine protease inhibitors, and a translationally controlled tumor protein (a histamine-releasing factor), also have been described in the venom [9,13–16].

The molecular mechanism by which crude venom induces deleterious activities is under investigation. Despite the complexity of venom composition, just few toxins as PLDs have their participation better understood in the pathology triggered by the accidents [2,4]. There is strong evidence for the participation of PLDs family members, also named dermonecrotic toxin, as playing a role in the skin lesions, which are distinguished by macroscopic dermonecrosis and diffuse inflammatory response at the bite site (histologically described as an

* Corresponding author at: Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil.
E-mail address: veigas@ufpr.br (S.S. Veiga).

ANEXO 2 – ARTIGO 2 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO



Review

Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotoools for the Development of Novel Therapeutics

Daniele Chaves-Moreira ¹, Fernando Hitomi Matsubara ¹, Zelinda Schemczssen-Graeff ¹, Elidiana De Bona ¹, Vanessa Ribeiro Heidemann ¹, Clara Guerra-Duarte ² , Luiza Helena Gremski ¹, Carlos Chávez-Olórtegui ² , Andrea Senff-Ribeiro ¹, Olga Meiri Chaim ¹, Raghuvir Krishnaswamy Arni ³ and Silvio Sanches Veiga ^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba 81531-970, PR, Brazil; moreirad@pennmedicine.upenn.edu (D.C.-M.); fernando_matsubara@hotmail.com (F.H.M.); zelinda1985@hotmail.com (Z.S.-G.); lidibona@gmail.com (E.D.B.); vane.biomed@gmail.com (V.R.H.); luiza_hg@yahoo.com.br (L.H.G.); senffribeiro@gmail.com (A.S.-R.); olgachaim@gmail.com (O.M.C.)

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; claragd@gmail.com (C.G.-D.); olortegi@icb.ufmg.br (C.C.-O.)

³ Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, SP, Brazil; arni@sjrp.unesp.br

* Correspondence: veigass@ufpr.br; Tel.: +55-(41)-3361-1776

Received: 6 May 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 19 June 2019



Abstract: Brown spider envenomation results in dermonecrosis with gravitational spreading characterized by a marked inflammatory reaction and with lower prevalence of systemic manifestations such as renal failure and hematological disturbances. Several toxins make up the venom of these species, and they are mainly peptides and proteins ranging from 5–40 kDa. The venoms have three major families of toxins: phospholipases-D, astacin-like metalloproteases, and the inhibitor cysteine knot (ICK) peptides. Serine proteases, serpins, hyaluronidases, venom allergens, and a translationally controlled tumor protein (TCTP) are also present. Toxins hold essential biological properties that enable interactions with a range of distinct molecular targets. Therefore, the application of toxins as research tools and clinical products motivates repurposing their uses of interest. This review aims to discuss possibilities for brown spider venom toxins as putative models for designing molecules likely for therapeutics based on the status quo of brown spider venoms. Herein, we explore new possibilities for the venom components in the context of their biochemical and biological features, likewise their cellular targets, three-dimensional structures, and mechanisms of action.

Keywords: brown spider; venom; *Loxosceles*; toxins; biotoools; drug targets; novel therapeutics

Key Contribution: The functional diversity of biological toxins and the often-unique selectivity of their effects coupled with high potency inspire their application or repurposing as research tools and clinical products. This review discusses the chemistry, biology, and clinical effects of some toxins found in brown spider venom that point to potential biotechnological and drug discovery.

1. Introduction: Venom Contents and Cellular Targets

Spider venoms are mixtures of biologically active peptides, proteins, glycoproteins, and small organic molecules which interact with cellular and molecular targets to trigger severe, sometimes fatal effects. However, the spider venom could be particularly interesting for the treatment of general diseases as a scaffold for toxin-based drug research. Several venom-based drugs or venom-derived molecules have found extensive use as tools for therapies. For instance, “Captopril”, a competitive inhibitor of angiotensin-converting enzyme, is broadly used and well-established antihypertensive

ANEXO 3 – ARTIGO 3 PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

REVIEW

OPEN ACCESS



**Journal of
Venomous Animals and Toxins
including Tropical Diseases**

ISSN 1678-9199

www.jvat.org

Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins?

Luiza Helena Gremski¹ , Fernando Hitomi Matsubara¹ , Hanna Câmara da Justa¹ , Zelinda Schemczssen-Graeff¹,
Antonielle Beatriz Baldissera¹, Pedro Henrique de Caires Schluga¹ , Isabel de Oliveira Leite¹,
Marianna Boia-Ferreira¹, Ana Carolina Martins Wille², Andrea Senff-Ribeiro¹ , Silvio Sanches Veiga^{1*}

¹Department of Cell Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil.

²Department of Molecular Structural Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil.

Keywords:

Astacins
Serine proteases
Serpins
Knottins
TCTP
Hyaluronidases
Allergens
Spider venom

Abstract

Accidents caused by the bites of brown spiders (*Loxosceles*) generate a clinical condition that often includes a threatening necrotic skin lesion near the bite site along with a remarkable inflammatory response. Systemic disorders such as hemolysis, thrombocytopenia, and acute renal failure may occur, but are much less frequent than the local damage. It is already known that phospholipases D, highly expressed toxins in *Loxosceles* venom, can induce most of these injuries. However, this spider venom has a great range of toxins that probably act synergistically to enhance toxicity. The other protein classes remain poorly explored due to the difficulty in obtaining sufficient amounts of them for a thorough investigation. They include astacins (metalloproteases), serine proteases, knottins, translationally controlled tumor proteins (TCTP), hyaluronidases, allergens and serpins. It has already been shown that some of them, according to their characteristics, may participate to some extent in the development of loxoscelism. In addition, all of these toxins present potential application in several areas. The present review article summarizes information regarding some functional aspects of the protein classes listed above, discusses the directions that could be taken to materialize a comprehensive investigation on each of these toxins as well as highlights the importance of exploring the full venom repertoire.

* Correspondence: veigass@ufpr.br

<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0188>

Received: 17 January 2021; Accepted: 9 March 2021; Published online: 12 July 2021



On-line ISSN 1678-9199 © The Author(s). 2021 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO 4 – COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1146

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.218485/2017-74

APROVADO/APPROVAL: 27/02/2018 – R.O. 01/2018

TÍTULO: Serpina do veneno da aranha marrom: clonagem molecular e expressão recombinante em modelo eucarioto, caracterização bioquímica e funcional e avaliação de aplicações biotecnológicas.

TITLE: Serpin of the brown spider venom: molecular cloning and recombinant expression in an eukaryotic expression system, biochemical and functional characterization and evaluation of biotechnological applications.

AUTORES/AUTHORS: Silvio Sanches Veiga, Zelinda Schemczssen, Bruno Cesar Antunes, Larissa Vuitika, Marianna Bóia Ferreira, Hanna Câmara da Justa.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

ANEXO 5 – CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICA



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A147629

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A147629**
 Usuário: **Universidade Federal do Paraná**
 CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:
☒ **Pesquisa Científica** ☐ **Bioprospecção** ☐ **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Loxosceles spp

Título da Atividade: **Estudo do veneno e das toxinas nativas e recombinantes das aranhas do gênero Loxosceles**

Equipe

Luiza Helena Gremski	Universidade Federal do Paraná
Silvio Sanches Veiga	Universidade Federal do Paraná
Andrea Senff Ribeiro	Universidade Federal do Paraná
Olga Meiri Chaim	Universidade Federal do Paraná
Raghuvir Krishnaswamy Arni	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Helena Bonciani Nader	UNIFESP
João Carlos Minozzo	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
Ana Carolina Martins Wille	UEPG
Alexandra Acco	UFPR
José Rosa Gomes	UEPG
Bruno Cesar Antunes	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

Parceiras Nacionais

60.453.032/0001-74 / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
 76.659.820/0003-13 / Pontifícia Universidade Católica do Paraná
 80.257.355/0001-08 / Universidade Estadual de Ponta Grossa
 48.031.918/0011-04 / UNESP São José do Rio Preto
 76.416.866/0040-56 / Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

Resultados Obtidos

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido:	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
Código do requerimento:	PI11073500
Número da patente:	PI11073500
Órgão no qual foi requerido:	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
Código do requerimento:	BR1020120228491
Número da patente:	BR1020120228491

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	Artigo Científico: SILVEIRA, R. B. et al., 2006; E
Identificação do meio onde foi divulgado:	Artigo científico: Ferrer, V.P. et al., 2013; PLoS
Identificação do meio onde foi divulgado:	CHAVES-MOREIRA, D. et al., 2017, Journal of C
Identificação do meio onde foi divulgado:	MARIUTTI, R. et al., 2017, Journal of Cellular Bi
Identificação do meio onde foi divulgado:	Trevisan-Silva, D. et al., 2017, Scientific Data, v.
Identificação do meio onde foi divulgado:	MATSUBARA, F. H. et al., 2017, INSECT MOLEC
Identificação do meio onde foi divulgado:	VUITIKA, L. et al., 2016, Biochimica and Biophy
Identificação do meio onde foi divulgado:	MORGON, A. M. et al., 2016, Biochimie (Paris. P
Identificação do meio onde foi divulgado:	MEISSNER, G. O. et al., 2016, Journal of Molecu
Identificação do meio onde foi divulgado:	BEDNASKI, A.V. et al., 2015, Toxicon, v. 98, p. 6
Identificação do meio onde foi divulgado:	CORONADO, M. et al., 2015, Current Protein an
Identificação do meio onde foi divulgado:	BUCH, D. R. et al., 2015, Toxicon, v. 108, p. 154-
Identificação do meio onde foi divulgado:	MARTINS-WILLE, A. C. et al., 2013, Toxicon, v. 1
Identificação do meio onde foi divulgado:	Matsubara, F.H. et al., 2013, Toxicon, v. 71, p. 14
Identificação do meio onde foi divulgado:	Trevisan-Silva, D. et al., 2013, Toxicon, v. 76, p.
Identificação do meio onde foi divulgado:	VUITIKA, L. et al., 2013, Journal of Cellular Bioc
Identificação do meio onde foi divulgado:	Sade, Y. B. et al., 2012, International Journal of
Identificação do meio onde foi divulgado:	Nowatzki, J. et al., 2012, Toxicon, v. 60, p. 396-4
Identificação do meio onde foi divulgado:	Ullah, A. et al., 2011, Acta Crystallographica. Se

Identificação do meio onde foi divulgado:	Gomes, M. T. et al., 2011, Toxicon, v. 57, p. 574-
Identificação do meio onde foi divulgado:	Chaim, O. M. et al., 2011, Biochimica and Bioph
Identificação do meio onde foi divulgado:	CHAIM, O. M. et al., 2011, Toxins, v. 3, p. 309-34
Identificação do meio onde foi divulgado:	Chaves-Moreira, D. et al., 2011, Journal of Cellu
Identificação do meio onde foi divulgado:	Giuseppe, P.O. et al., 2011, . Biochemical and B
Identificação do meio onde foi divulgado:	Trevisan-Silva, D. et al., 2010, Biochimie (Paris.
Identificação do meio onde foi divulgado:	Nowatzki, J. et al., 2010, Toxicon, v. 56, p. 535-5
Identificação do meio onde foi divulgado:	GREMSKI, L. H. et al., 2010, Molecular Biosyste
Identificação do meio onde foi divulgado:	Pauli, I. et al., 2009, Toxicon, v. 53, p. 660-671.
Identificação do meio onde foi divulgado:	Paludo, K. S. et al., 2009, Comparative Biochem
Identificação do meio onde foi divulgado:	Chaves-Moreira, D. et al., 2009, Journal of Cellu
Identificação do meio onde foi divulgado:	APPEL, M. et al., 2008, Biochimica et Biophysic
Identificação do meio onde foi divulgado:	KUSMA, J. et al., 2008, Biochimie (Paris), v. 90,
Identificação do meio onde foi divulgado:	DE OLIVEIRA CHRISTOFF, A. et al., 2008, Toxic
Identificação do meio onde foi divulgado:	SILVEIRA, R. B. et al., 2007, Toxicon, v. 49, p. 7!
Identificação do meio onde foi divulgado:	SILVEIRA, R. B. et al., 2007, Biochimie (Paris), v
Identificação do meio onde foi divulgado:	SILVEIRA, R. B. et al., 2007, Biochemical Journ
Identificação do meio onde foi divulgado:	KALAPOTHAKIS, E. et al., 2007, Toxicon, v. 50,
Identificação do meio onde foi divulgado:	RIBEIRO, R. O. S. et al., 2007, Toxicon, v. 50, p.
Identificação do meio onde foi divulgado:	CHAIM, O. M. et al., 2006, Toxicology and Appli
Identificação do meio onde foi divulgado:	PALUDO, K. S. et al., 2006, Toxicon, v. 47, p. 84
Identificação do meio onde foi divulgado:	LUCIANO, M. N. et al., 2004, Journal of Histoche
Identificação do meio onde foi divulgado:	SILVA, P. H. et al., 2003, Toxicon, v. 41, p. 155-1
Identificação do meio onde foi divulgado:	MONTEIRO, C. L. B. et al., 2002, Toxicon, v. 40,
Identificação do meio onde foi divulgado:	Zanetti, V. C. et al., 2002, Blood Coagulation and

Identificação do meio onde foi divulgado:	SILVEIRA, R. B. et al., 2002, Toxicon, v. 40, p. 8'
Identificação do meio onde foi divulgado:	Ospedal, K. Z. et al., 2002, International Journal
Identificação do meio onde foi divulgado:	VEIGA, S. S. et al., 2001, Thrombosis Research,
Identificação do meio onde foi divulgado:	VEIGA, S. S. et al., 2001, Brazilian Journal of Me

Data do Cadastro: **17/07/2018 10:59:29**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:41** de **25/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADIÇÃOAL
 ASSOCIADO - SISGEN